

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I –
Großhadern
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck
Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

**SDF-1-Fractalkine-GPI-Fusionsmolekül erhöht die
Rekrutierung der embryonalen Endothelialen Progenitor Zellen in
ischämischer Muskulatur**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Franziska Götz

aus
Magdeburg

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess
Prof. Dr. med. Bernhard Kuch

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FCAR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2012

1. Einleitung	4
1.1. Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).....	4
1.2. Therapeutische Neovaskularisation.....	6
1.2.1. Vaskulogenese.....	7
1.2.2. Angiogenese.....	7
1.2.3. Arteriogenese.....	8
1.3. Endotheliale Progenitorzellen – EPC	9
1.3.1. Embryonale EPC.....	11
1.3.2. EPC verbessern die Neovaskularisation.....	11
1.4. Mobilisation und Homing von EPC	12
1.5. Chemokine.....	14
1.5.1. Stromal cell- derived factor 1 – SDF-1	15
1.5.2. Fractalkine – CX3CL1.....	19
1.5.3. Glycosylphosphatidylinositol-Anker - GPI-Anker	20
2. Zielsetzung der Arbeit: Verbesserung der Rekrutierung von eEPCs in ischämischen Geweben.....	22
3. Material und Methoden	23
3.1. in vitro Methoden	23
3.1.1. Amplifizierung von humanen SDF-1 α aus dem pCMVsport6 –Vektor.....	23
3.1.2. Klonierung des SDF-1 α in den pIRES2-Vektor.....	24
3.1.3. Amplifizierung und Klonierung S1-FG in den Vektor pCMVaavGFP.....	25
3.1.4. In vitro Überexpression von S1FG.....	26
3.1.5. Membranfärbung von Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen.....	27
3.1.6. In vitro Adhäsionsversuche mit Monozyten und eEPC.....	27
3.2. in vivo Methoden.....	29

3.2.1.	<i>Modell des ischämischen Hinterlaufs im Kaninchen</i>	29
3.2.2.	<i>Langzeitversuche: Kollateralwachstum, Perfusion und Kapillardichte</i>	33
3.2.3.	<i>SDF-1 – PECAM-1 – Färbung</i>	39
3.3.	<i>Statistische Analysen</i>	40
4.	<i>Ergebnisse</i>	41
4.1.	<i>Amplifizierung hSDF-1α aus pCMV-Sport-6 (RZPD)</i>	41
4.2.	<i>Ligation hSDF-1 mit pIRES2-Plasmid</i>	41
4.3.	<i>Ligation Fusionsmolekül mit pCMVaaVGFP-Plasmid</i>	42
4.4.	<i>Überexpression von S1FG in vitro</i>	43
4.5.1.	<i>in vitro Adhäsion von eEPC und Monozyten bei IL8</i>	44
4.5.3.	<i>in vitro Adhäsion von eEPC und Monozyten bei SDF1</i>	47
4.6.	<i>in vivo Adhäsion: erhöhte Detektion von Dil-markierten eEPCs nach S1FG-Transfektion im ischämischen Muskel</i>	50
4.7.	<i>Langzeitversuche – Verbesserung des proangiogenen Potentials von eEPCs durch S1FG-Vorbehandlung</i>	53
4.7.1.	<i>Kapillarwachstum</i>	53
4.7.2.	<i>Kollateralbildung</i>	54
4.7.3.	<i>Perfusion (Cinedensometrie und Mikrosphären-Messung)</i>	56
4.8.	<i>SDF-1-Expressions-Nachweis im Gewebe</i>	58
5.	<i>Diskussion</i>	60
5.1.	<i>Beeinflussung der Adhäsion und des Homing von eEPCs</i>	61
5.1.1.	<i>In vitro Beeinflussung der Adhäsion</i>	61
5.1.2.	<i>Bedeutung von S1FG für das Homing von eEPCs in vivo</i>	62
5.2.	<i>Auswirkung der modifizierten Rekrutierung von eEPCs durch S1FG</i>	64
5.2.1.	<i>Beeinflussung der Kollateralbildung</i>	64
5.2.2.	<i>Beeinflussung der Kapillarbildung</i>	64
5.2.3.	<i>Einfluss auf die regionale Perfusion</i>	65
5.3.	<i>Signalweg von SDF-1, Fractalkine und eEPCs</i>	65

5.4. Ausblick für die therapeutische Neovaskularisierung und Grenzen des Modells sowie Grenzen bei der Anwendung am Menschen.....	67
5.5. Zusammenfassende Diskussion	69
6. Literaturverzeichnis	71
7. Abbildungsverzeichnis, Software und Datenbanken	79
7.1. Datenbanken	79
7.2. Software	79
7.3. Abbildungsverzeichnis/ Quellennachweis.....	79
8. Abkürzungen.....	80
9. Anhang.....	83
9.1. Danksagung.....	83
9.2. Lebenslauf	84

1. *Einleitung*

1.1. *Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)*

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit gehört neben Myokardinfarkt und Schlaganfall zu den Erkrankungen, die vor allem in den Industriestaaten eine hohe Inzidenz, Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung aufweisen. Durch verschiedene Risikofaktoren (Rauchen, Diabetes mellitus, Alter oder Hypercholesterinämie) kann es frühzeitig zu klinischen Manifestationen und komplizierenden Verläufen kommen, die einer Therapie bedürfen. Ursächlich für diese Gefäßerkrankung ist meistens eine chronisch Arteriosklerose [Espinola-Klein 2009; Lawall et al. 2009; Huppert et al. 2009]. Seltene Ursachen (5-10%) sind Thrombangiitis obliterans, Takayasu-Syndrom, andere Angiitiden oder Kollagenosen [Scheinert 2007].

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit kommt es zu chronisch stenosierenden und okkludierenden Veränderungen der Aorta und der Extremitätenarterien mit nachfolgender Minderdurchblutung [Lawall et al. 2009; Huppert et al. 2010]. Am häufigsten sind die Arterien der unteren Extremitäten betroffen [Espinola-Klein 2009]. Die Prävalenz wird zwischen 3 und 10% angegeben, bei über 70-jährigen beträgt diese bis 20% [Espinola-Klein 2009].

Bei ca. 5% der Bevölkerung kommt es zu Symptomen. Hauptsymptome sind belastungsabhängige ischämische Schmerzen, die sich distal einer Stenose äußern und sich in Ruhe zurückbilden (Claudicatio intermittens). Distal von Engstellen kommt es zu trophischen Störungen, wie Muskelatrophie, Polyneuropathie und verzögerter Wundheilung. Häufig entstehen auch Ulzerationen durch die Minderperfusion. Ab einer Verengung von 90% des Gefäßlumens sind die Pulse distal der Stenose nicht mehr tastbar. Im Verlauf der Erkrankung können sich bei den asymptomatischen Patienten Kollateralkreisläufe bilden, die zur Symptomreduzierung durch Erhalt der distalen Perfusion führen.

Die pAVK kann in 3 Typen eingeteilt werden: Aortoiliakaler Typ (Becken-Typ, ca. 35%), Oberschenkeltyp (ca. 50%) und Unterschenkeltyp (oder auch peripherer Typ genannt; ca. 15%). Dabei haben Patienten des Beckentyps typischerweise belastungsabhängige Schmerzen in den Oberschenkel oder im Gesäß. Die

Symptome des Oberschenkeltyps äußern sich durch Schmerzen in den Waden bei Belastung und beim peripheren Typ durch Schmerzen in den Füßen mit einer begleitenden Polyneuropathie. Diese Symptome führen wiederum zur Immobilität der Patienten.

Klinisch wird die pAVK nach Fontaine in 4 Stadien eingeteilt.

Stadium I: Beschwerdefreiheit

Stadium II: Claudicatio intermittens (= Belastungsschmerz)

a) Schmerzfreie Gehstrecke über 200m

b) Schmerzfreie Gehstrecke unter 200m

Stadium III: Ruheschmerz der ischämischen Muskulatur

Stadium IV: zusätzlich zum Ruheschmerz besteht eine Nekrose, eine Gangrän oder ein Ulkus distal der Stenose der betroffenen Extremität.

Im Stadium III und IV spricht man dann von einer kritischen Ischämie.

Grundsätzliche Ziele der Therapie der pAVK sind Reduktion des sekundären Risikoprofils und Verbesserung der peripheren Durchblutung. Im Stadium I stehen daher die Behandlung und Reduktion der vaskulären Risikofaktoren im Vordergrund. Zusätzlich sind im Stadium II ergotherapeutisches Gehtraining zur Verbesserung der Mobilität [Schulte 2009], zum Teil kombiniert mit einer medikamentösen Therapie (vasoaktive Substanzen wie Cilostazol) zur Verbesserung der regionalen Durchblutung [Schulte 2009; Gresele et al. 2011], indiziert. Es werden auch medikamentös Thrombozytenaggregationshemmer wie Aspirin oder Clopidogrel eingesetzt, die eine verminderte Thrombusbildung an Engstellen bewirken [Schulte 2009; Nikol 2007]. Aber auch Prostaglandine, die eine Vasodilatation bewirken, sind im Stadium II oder III indiziert.

Eine Revaskularisation durch eine perkutane transluminale Angioplastie und Stent-Implantation wird zur Verbesserung der Durchblutung angestrebt. Eine weitere Option bietet eine operative Revaskularisation – z.B. durch eine Thrombendarteriektomie, bei der das stenosierende Atherom inklusive Intima ausgeschält wird, oder durch eine Bypass-Operation, bei der das verengte Gefäßabschnitt mittels autologem Venengraft oder körperfremdem Material überbrückt wird [Schulte 2009]. Ist eine Extremität z.B. bei Auftreten von Nekrosen durch die Ischämie bereits derart stark geschädigt, bleibt oft nur eine Amputation der

betroffenen Extremitätenabschnitte als Ultima ratio. Das Risiko für eine Amputation beträgt ca. 2% [Espinola-Klein 2009].

Eine therapeutische Neovaskularisation durch biologische Wachstumsfaktoren könnte für Patienten, bei denen die Therapieoptionen bereits ausgeschöpft sind, eine vielversprechende Option bieten [Nikol 2007; Kopp et al. 2004]. Dabei wird eine kausale Therapie angestrebt, um Amputationen zu vermeiden oder eine kritische Ischämie der Stadien III/ IV in das Stadium II zurückzuführen.

Einerseits steht dazu das Prinzip der Gentherapie zur Verfügung, das die natürlich vorkommende Gefäßbildung über z.B. verlängertes Wirken von Wachstumsfaktoren stimuliert. Andererseits stellt der Ansatz der Stammzell- und Progenitorzelltherapie eine weitere Therapieoption dar [Nikol 2007; Kopp et al. 2004]. Die Gabe von Proteinen ist demgegenüber aufgrund der geringen Proteinhalbwertszeit in der Regel für diese Ansätze der therapeutischen Neovaskularisation ungeeignet.

1.2. Therapeutische Neovaskularisation

In adulten Organismen induziert Hypoxie Gefäßneubildung. Dabei finden 3 Mechanismen statt: Vasculogenese, Arteriogenese und Angiogenese.

Therapeutische Neovaskularisation ist ein Therapieansatz zur Behandlung von chronischer Ischämie, um über die Ausbildung von Kollateralkreisläufen und Kapillaren die Perfusion ischämischer Gewebe zu verbessern, nachdem sich die physiologische körpereigene Antwort erschöpft hat.

Wachstumsfaktoren, die an der Induktion therapeutischer Neovaskularisation beteiligt sind, seien hier nur kurz erwähnt VEGF (vascular endothelial growth factor) [Breier et al. 1992; Risau 1994; Folkman 1998; Ferrara 2000; Carmeliet 2000], bFGF (basic fibroblast growth factor) [Folkman 1987; Leberer et al. 2003], PlGF, SDF-1, HGF; GM-CSF; G-CSF; Ang-1; HIF-1 α , PDGF-b [Folkman 1987, Carmeliet 2000 und 2003; Schaper et Scholz. 2003; Kopp et al. 2004; Kupatt 2007 und 2010].

Medikamentös können die Prozesse der Angiogenese und der Arteriogenese durch Statine hervorgerufen werden. Über die Aktivierung der Proteinkinase AKT wird dieser Effekt begünstigt [Kureishi et al. 2000; Dimmeler et al. 2001].

Therapeutische Neovaskularisation kann durch Gen- oder Stammzelltherapie bzw. durch die Kombination beider Ansätze induziert werden.

1.2.1. Vaskulogenese

In der Vergangenheit ging man davon aus, dass Vaskulogenese nur ein Prozess der Embryogenese beschreibt. Heute gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass auch postnatal eine Vaskulogenese von Knochenmarksvorläuferzellen ausgehen und eine de-novo-Gefäßneubildung durch migrierende EPCs induziert werden kann. Bei der embryonalen Vaskulogenese entsteht ein früher Gefäßplexus aus Angioblasten des Mesoderms, dagegen im postnatalen Prozess aus CD34-positiven, aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen. Beiden Prozessen ist gleich, dass die Zellen einen gemeinsamen Vorläufer haben, den Hämangioblast. Embryonale Zellen können unter anderem durch Einwirkung von FGF und VEGF differenzieren und aus dem primitiven Gefäßplexus erste einfache Gefäße entwickeln. In adulten Organismen haben die Knochenmarkszellen (BMC) eine induzierende Wirkung auf die Angiogenese [Carmeliet 2000 und 2003]. Dabei ist umstritten, ob diese Zellen selbst differenzieren und sich in die vorhandenen Gefäßstrukturen eingliedern können.

1.2.2. Angiogenese

Als Angiogenese definiert man Kapillarwachstum durch Endothelproliferation und -migration. Der Begriff Angiogenese war als erstes zur Beschreibung von Wachstum endothelialer Gefäßknospen aus bestehenden postkapillären Venolen verwendet worden [Isner et al. 1996; Carmeliet 2000]. Angiogenese kann als Reparaturmechanismus oder im Rahmen von Tumorbildung und Metastasierung im adulten Mechanismus auftreten.

Der Angiogeneseprozess wird durch Hypoxie und Ischämie getriggert [Carmeliet 2003; Schaper et Scholz. 2003]. So werden EPC durch den Um- bzw. Abbau extrazellulärer Matrix und durch Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren

und Chemokinen in hypoxischen Geweben rekrutiert und integriert. Durch nachfolgende Proliferation der Endothelzellen kommt es zum Aussprossen neuer Kapillaren oder vorhandener Kapillaren [Carmeliet 2000]. Zu den Beispielen der beteiligten Faktoren, die an der Initiierung der Angiogenese beteiligt sind, gehören unter anderen: VEGF [Breier et al. 1992; Risau 1994; Folkman 1998; Ferrara 2000; Kupatt et al. 2010], Hsp90 [Pfosser et al. 2005] oder FGF [Lebherz et al. 2003]. Weiterhin sind der Vasodilator NO [Kupatt et al. 2007], sowie Faktoren wie Ang1, PECAM, VE-Cadherin, IGF-1, HIF1 α , PDGF und auch MMPs im komplexen Prozess der Angiogenese beteiligt [Folkman 1987; Schaper et Scholz. 2003, Carmeliet 2003]. Perizyten oder transendotheliale Zellbrücken haben in diesem Prozess eine besondere Rolle, da in der Regel Neokapillaren ohne Maturierung regredieren. Dabei können ein Teil der neugebildeten Kapillaren glatte Muskelzellen und Perizyten aufweisen, die die neugebildeten Gefäßstrukturen schützend bedecken und eine Stabilisierung erzeugen [Carmeliet 2000].

1.2.3. Arteriogenese

Der Begriff Arteriogenese wurde erstmals von Schaper 1996 benutzt und wird als der Prozess bezeichnet, bei dem sich vorhandene Gefäße zu größeren arteriellen Kollateralen entwickeln und ein Wachstum von Endothelzellen und glatten Muskelzellen stattfindet [Arras et al. 1998; Carmeliet 2000]. Im Gegensatz zur Angiogenese ist Arteriogenese hypoxieunabhängig [Schaper et al. 2003]. Das Endothel wird vor allem durch Scherkräfte, aber auch durch einen erniedrigten Perfusionsdruck aktiviert [Schaper et Scholz. 2003]. Darunter werden im Rahmen einer Entzündungsreaktion z.B. NO oder Transkriptionsfaktoren wie z. B. HIF1 α freigesetzt. Diese führen weiter zur Ausschüttung von Zytokinen wie MCP-1 oder GM-CSF. Auch PDGF, FGF und TGF sind in diesem Prozess involviert. Es kommt dadurch zum Anlocken und Aktivieren von Entzündungszellen (vor allem Monozyten und Makrophagen), die wiederum eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) und darüber eine verbesserte Mikrozirkulation bewirken [Carmeliet 2000]. Weiterhin werden Perizyten und glatte Muskelzellen vermehrt angelockt und können sich an die neuen Gefäßstrukturen anlagern und diese weiter stabilisieren.

Dies führt wiederum zur Hypertrophie von Endothelzellen und glatter Muskelzellen und somit zur Vergrößerung des Gefäßes [Schaper et Scholz. 2003]. Diesen Prozess nennt man auch vaskuläres Remodelling. Im Verlauf können so kleinere Gefäße ihr Lumen bis auf ein 20-faches ihres Ausgangswertes ausweiten und eine Gewebperfusion sichern [Carmeliet 2000].

1.3. *Endotheliale Progenitorzellen – EPC*

In früheren Vorstellungen glaubte man, dass Endothelvorläuferzellen nur im Embryonalstadium vorhanden sind. Solche Progenitorzellen konnten jedoch auch im Knochenmark und im peripheren Blut Erwachsener identifiziert werden. Asahara und Kollegen konnten erstmals 1997 aus peripherem Blut humane mononukleäre Zellen isolieren, die sowohl hämatopoetische (z.B. CD34; AC133, CXCR4) als auch frühe endothelzellspezifische Oberflächenmarker (flk-1 [= VEGF-R2 = KDR]; vWF; CD31; ac-uptake Di-LDL) aufwiesen. Diese Zellen wurde endotheliale Progenitorzellen genannt, da diese in vitro in einen endothelialen Phänotyp differenzieren konnten. Im Gegensatz zu humanen EPC haben murine EPC einen Phänotyp mit Expression von folgenden Markern: Sca-1, c-Kit und Tie-2.

Jedoch können diese Zellen der hämatopoetischen Reihe auch eine Überlappung mit anderen frühen Progenitorzellen aufweisen. In frühen Stadien sind auch lymphoide Oberflächenantigene nachweisbar, so CD14, CD45 und CD 115. Diese lymphoiden Zellen sind selbst nicht in der Lage, Gefäße zu bilden oder Gefäßbildung anzuregen. EPC und HSC (hämatopoetische Stammzellen) haben den Hämangioblast als gemeinsamem Vorläufer [Asahara et Isner. 2002; Masuda et Asahara. 2003; Rafii et Lyden. 2003; Asahara et Kawamoto. 2004].

Die EPC selbst können wiederum in 2 Gruppen unterteilt werden: frühe (early) und späte (late oder outgrowing) EPC [Rafii et Lyden. 2003; Khakoo et Finkel. 2005; Kirton und Xu. 2010].

Für frühe EPC wurden folgende Antigene nachgewiesen: CD34, VEGF-R2, CD133, CD31, CD14, CD45, CD115, vWF. Diese Zellen zeigten die Aufnahme von acetylierten Di-LDL auf und konnten Zellkolonien mit anderen Zellen in vitro bilden. Weiterhin waren sie in der Lage zur Phagozytose von Bakterien und zur Sekretion

von proangiogenen Faktoren (Zytokine, die eine parakrine Funktion auf die Vaskulogenese/ Angiogenese ausüben).

Dagegen fehlen den späten EPC die Marker CD14, CD45 CD133 und CD 115 bei gleichzeitigem Nachweis von endothelialen Markern wie CD34, VEGF-R2 und CD 31. Zusätzlich tragen die späten EPC außerdem die Marker: CD11b, VE-Cadherin, E-Selektin, c-Kit und Tie-2 und sind in der Lage, NO durch eNOS-Aktivität zu synthetisieren. Späte EPC sind in der Lage, flache Zellreihen (Monolayer) zu bilden und zeigen eine hohe proliferative Kapazität, die sowohl in vitro als auch in vivo Gefäßbildung induzieren konnten [Kirton und Xu. 2010]. Späte EPCs wiesen nach 3 bis 4 Wochen in vitro-Kultivierung die morphologischen und funktionellen Eigenschaften von reifen Endothelzellen auf [Hristov et al. 2008].

EPC können derzeit aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark isoliert werden, wobei die Konzentration von CD34-positiven Zellen im Knochenmark höher ist als im peripheren Blut.

EPC können die Sekretion von Zytokinen wie z.B. VEGF, HGF oder G-CSF induzieren oder selbst ausüben.

Für EPCs konnte über die Jahre in verschiedenen akuten sowie chronischen Ischämie-Modellen ein deutliches angiogenes Potential dargestellt werden [Rafii et Lyden. 2003]. Dabei werden verbesserter Blutfluss bzw. verbesserte Perfusion und weniger Nekrosen bzw. Amputationen beobachtet und diese Effekte auf dessen proliferierende, migrierende und sekretierende Kapazität zurückgeführt [Asahara et Kawamoto. 2004; Schmidt, Brixius, Bloch. 2007; Eguchi, Masuada et Asahara. 2007]. EPC sind aber nicht nur ein Bestandteil der Neovaskularisation bei Ischämie/ Hypoxie, sondern auch wichtig für die vaskuläre Hämostase im Rahmen des vaskulären Remodellings während der Arteriosklerose [Hristov et al. 2008]. Auch im Bereich der Krebsforschung sind EPC von Bedeutung, da diese Tumorangiogenese induzieren und fördern können [Khakoo et Finkel. 2005].

1.3.1. Embryonale EPC

Gegenüber adulten EPC, die den Nachteil primärer Zellpräparation aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark tragen, stellen embryonale EPC eine Zelllinie mit besonderen Eigenschaften dar. 1999 konnten erstmals Hatzopoulos et al. EPCs aus Mäuseembryonen isolieren. Embryonale EPCs (eEPC) wurden am Tag 7,5 aus embryonalen Aorten von transgenen Mäusen (Thrombomodulin-lacZ positiv) entnommen und nach Kultivierung zu einer primären Zelllinie isoliert und etabliert. Diese eEPC zeigen wie Stammzellen und im Gegensatz zu adulten EPCs ein unbegrenztes Wachstumsverhalten, jedoch bei stabilem Phänotyp. Auch die eEPCs exprimieren Stammzell- und Endothelzellmarker (ac uptake Di-LDL, GATA 4 + 6, Tie-2, PSGL-1, E-Selektin). CD 34 und β 2-Integrine sind auf eEPC nicht nachweisbar. Ein weiterer Vorteil dieser proangiogen wirksamen embryonalen Zellen ist, dass sie kein MHC-1 exprimieren und somit immunprivilegiert und gegen NK-Zellen resistent sind [Wei 2004].

Diese Zellen wandern wie die adulten EPC in ischämische Gewebe und tragen essentiell zur Neovaskularisation und somit zur Gewebsregeneration bei [Kupatt et al. 2005].

1.3.2. EPC verbessern die Neovaskularisation

Der Einsatz von EPC für die Neovaskularisation ergab sich aus verschiedenen Aspekten: EPCs waren in der Lage in vitro und in vivo in Endothelzellen zu differenzieren und gezielt in ischämische Gebiete einzuwandern und postnatale Neovaskularisation zu bedingen [Asahara et al. 1997 und 1999; Takahashi et al. 1999; Kalka et al. 2000].

Eine Inkorporation von zirkulierenden EPC aus dem Knochenmark in Kapillaren ischämischer Skelettmuskeln des Kaninchenhinterlaufs und Lokalisation von EPCs an der Grenze zu Infarktgebieten in Ischämiemodellen der Maus bestätigten die Schlüsselrolle in der Neovaskularisation [Asahara et al. 1999]. Ex vivo explantierte EPC erzeugten eine verstärkte Neovaskularisation durch eine erhöhte Kapillardichte, eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine verringerte Infarktgröße nach

Myokardinfarkt [Kawamoto et al. 2001]. Andere Studien konnten zeigen, dass Knochenmarkszellen an der Neoangiogenese während der Wundheilung, einer Beinischämie, nach Myokardinfarkt, während Arteriosklerose, sowie während der Embryogenese und des Tumorwachstums beteiligt sind [Rafii et Lyden. 2003; Khakoo et Finkel. 2005]

Analog induzierten eEPCs nach Retroinfusion im chronischen Ischämiemodell des Kaninchenhinterlaufs die Kapillar- und Kollateralbildung [Kupatt et al. 2005].

1.4. Mobilisation und Homing von EPC

Für Leukozyten ist die Rekrutierung in die Gebiete der Entzündungsprozesse gut beschrieben. Über Signal- und Adhäsionsvorgänge kommt es zu einem Selektin-unterstützten Rollen von aktivierten Leukozyten am Endothel. Dies erzeugt wiederum eine weitere Aktivierung von nachrückenden Leukozyten durch Chemokine (Chemotaxis). Chemokine aktivieren so die Integrinexpression, sodass eine feste Integrin-unterstützte Adhäsion der Entzündungszellen am Endothel stattfindet. Danach folgen der Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel (Diapedese) und letztendlich Migration und Invasion in die extrazelluläre Matrix [Imhof et Aurrand-Lions. 2004; Luster et al. 2005].

Das Homing von EPC scheint dem Prozess der Leukozytenrekrutierung ähnlich zu sein. Um jedoch die proangiogene Kapazität von autologen EPC nutzen zu können, müssen die Zellen zunächst aus dem Knochenmark mobilisiert und in die Blutzirkulation entlassen werden, damit sie dann gezielt in die Zielgewebe einwandern können. Kultivierte EPC, die in Organismen gezielt zur therapeutischen Neovaskularisation transplantiert werden, müssen jedoch auch ein gesondertes Signal empfangen (Chemotaxis), um in das Zielgewebe zu gelangen und dort in Endothelzellen zu differenzieren.

Verschiedene Mechanismen und Signalwege sind dazu fähig, autologe EPC aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Bei einem Trauma werden über inflammatorische Signaltransduktionswege die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen inkl. EPC stimuliert (GM-CSF, G-CSF) [Lapidot et Petit. 2002]. Ischämie triggert via Sekretion proangiogener Zytokine und Wachstumsfaktoren (VEGF, SDF-1, HIF-1 α)

ebenso die Mobilisation [Asahara et al. 1999, Kalka et al. 2000; Asahara et al. 2002; Khakoo et al. 2005; Eguchi, Masuda, Asahara. 2007; Broxmeyer. 2008].

Die Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statine) führen über den PI3-/AKT-Signalweg zur Erhöhung der Anzahl ausgeschwemmter EPC [Kureishi et al. 2000; Dimmeler et al. 2001; Losordo et al. 2004]. Aber auch EPO, Ang-1 sowie PIGF können eine verstärkte Mobilisation induzieren.

Um EPC aus dem Knochenmark zu entlassen, sind Matrix-Metalloproteinasen (insbesondere MMP-9) nötig [Rafii et al. 2003]. MMP-9 katalysiert dabei die Umwandlung des membrangebundenen Kit-Liganden in den löslichen Kit-Liganden. Erst danach können sich cKit-positive Zellen in die Zirkulation bewegen. Dies führt wiederum zu einem erhöhten SDF-1 und VEGF-Spiegel [Heissig et al. 2002]

Auch die Rekrutierung (Homing) der EPC in das Zielgewebe wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine (SDF-1, HIF-1 α , VEGF, HO-1, IL-8, MCP-1) hervorgerufen [Lapidot et al. 2002; Deshane et al. 2007; Chavakis, Urbich, Dimmeler. 2008].

Durch die Expression spezieller Oberflächenmarker wie flk-1 oder CXCR4 können die EPC in den Zielgeweben adhären und in das vorhandene Endothel inkorporieren und Vaskulogenese/ Angiogenese verstärken bzw. induzieren. Aber auch die Interaktion mit verstärkt exprimierten Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in Ischämiegebieten führt zum verbesserten Homing von EPCs [Zemani et al. 2008].

Eine besondere Rolle stellen hier die Selektine und Integrine dar. Selektine, insbesondere E- und P-Selektin (auf Endothel (E) und Thrombozyten (P); L-Selectin meistens nur bei Leukozyten) und die Interaktion mit PSGL-1, veranlassen die initiale Phase der Adhäsion, dem Rolling, wobei hier nur eine geringe Bindungsaffinität zum Endothel besteht [Nishiwaki et al. 2007; Foubert et al. 2007]. Jedoch ist diese erste EPC-Endothelzell-Interaktion beim Rolling reversibel, danach kommt es erst zur hochaffinen festen Adhäsion [Chavakis, Urbich, Dimmeler. 2008]. Diese feste Adhäsion wird über Integrine vermittelt. Bei den adulten EPC sind β 2-Integrine wichtig. Sie werden auf EPC selbst exprimiert und unterstützen die Bindung von EPC am Endothel [Chavakis et al. 2005].

Unter der verbesserten Adhäsion konnte die EPC-induzierte Neovaskularisation gesteigert werden.

Auch die Vorbehandlung von EPCs bzw. des Zielgewebes mit verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Chemokinen (z.B. SDF-1) konnte eine erhöhte Migration und Rekrutierung durch verbesserte Adhäsion am Endothel ischämischer Gewebe zeigen und damit die EPC-induzierte Neovaskularisation steigern (verbesserte Gewebperfusion und erhöhte Kapillardichte) [Yamaguchi et al 2003; Zemani et al. 2008].

1.5. Chemokine

Die Fähigkeit Leukozytenmigration, an Entzündungsstellen zu induzieren, wurde als erste Eigenschaft für Chemokine beschrieben [Charo et Taubman. 2004]. Dabei ist die Eigenschaft der Chemotaxis sehr wichtig für Leukozytenrekrutierung, Aktivierung, sowie Effektorfunktion, aber auch für die Hämatopoese und die Modulation der Angiogenese [Nelson et Krensky. 2001; Broxmeyer 2008]. Chemokine werden in 4 Gruppen eingeteilt. Die Einteilung findet nach der Position der ersten 2 Cysteine in der Aminosäuresequenz statt, sodass es eine C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokinfamilie gibt. Als Beispiele sind folgende Chemokine und deren Chemokin-Familie kurz genannt: Lymphotactin (XCL1) gehört der C-Familie an; Rantes (CCL5) und MCP-1 (CCL2) der CC-Familie; IL-8 (CXCL8); IP10 (CXCL10) und SDF-1 (CXCL12) der CXC-Familie und Fractalkine (CX3C) der CX3C-Familie. Weiterhin weisen einige Chemokine ein ELR-Motif auf, das vor allem in der CXC-Familie auftritt, und eine zusätzliche Aminosäuresequenz aus Glutamin-Leucin-Arginin ist. Chemokine, die diese ELR-Motif besitzen, weisen ein höheres angiogenes Potential auf. Dagegen sind ELR-negative Chemokine eher angiostatisch wirksam. ELR-Motif positive Chemokine sind IL8 und GRO α (CXCL1); IP10 und SDF-1 sind dagegen Beispiele für die ELR-negativen Chemokine [Nelson et Krensky. 2001]. Jedoch kann über die ELR-Präsenz nicht generalisiert auf die Eigenschaft angiostatisch oder proangiogen für alle Chemokine rückgeschlossen werden. SDF-1 besitzt das ELR-Motif nicht und ist dennoch eine Chemokine mit hohem proangiogenem Potential [Bernardini et al. 2003].

Die Chemokin-Wirkung (Chemotaxis) wird über ihren spezifischen Chemokin-Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor ist ein sich über 7 Transmembranbereiche

erstreckender G-Protein gekoppelter Rezeptor [Nelson et Krensky. 2001; Charo et Taubman. 2004; Apostolakis et al. 2006]. Nach Bindung des spezifischen Liganden werden die Rezeptoren internalisiert und phosphoryliert und lösen damit eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus. Die Namen der einzelnen Rezeptoren leiten sich von deren Liganden ab und erhalten zur Chemokine-Familie ein R für Rezeptor und werden fortlaufend nummeriert. So z.B.: CCR1 für Rantes, CXCR4 für SDF-1 oder Cx3CR1 für Fractalkine [Nelson et Krensky. 2001; Bernardini et al. 2003]. Die Expression von Chemokinen erfolgt auf verschiedenen Zellen, vor allem aber auf lymphoiden Zellen wie Monozyten, T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten aber auch auf Endothelzellen unterschiedlicher Gewebe wie Herz, Gehirn oder Gefäße und auch auf glatten Muskelzellen [Nelson et Krensky. 2001; Bernardini et al. 2003; Schober et Zerneck. 2007, Schober 2008].

Chemokine vermitteln die Koordination von Inflammation und Angiogenese. In der Angiogenese erhalten die Chemokine eine besondere Rolle, da diese direkt an der Endothelzellaktivierung, Mobilisation und Rekrutierung von Stammzellen sowie EPC und indirekt als Transkriptionsfaktor auf die Expression weiterer proangiogener Faktoren mitwirken und somit Neovaskularisation via Zellmigration, Zelladhäsion über Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen und Differenzierung induzieren können [Losordo et Dimmeler. 2004b; Crola Da Silva et al. 2009]. So kann IL8 (Interleukin8, CXCL8) Endothelzellwachstum induzieren und IP10 (CXCL10) die Endothelzellproliferation inhibieren. Rantes kann via CCR1 und CCR5 die initiale Monozyteninfiltration und somit Neointimawachstum verstärken [Schober et Zerneck. 2007].

1.5.1. Stromal cell- derived factor 1 – SDF-1

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), auch Chemokin-Ligand 12 (CXCL12) oder pre-B cell growth-stimulatingfactor (PBSF) genannt, ist ein Chemokin, das der Chemokinfamilie CXC angehört und vor allem Zellen der Inflammation aktiviert. Das Protein ist ca. 8 kDa groß und auf Chromosom 10 q11 kodiert, im Gegensatz zu den übrigen Chemokinen der CXC-Familie, die auf Chromosom 4q lokalisiert sind

[Shirozu et al. 1995]. Es gibt mehrere Isoformen, die durch alternatives Splicing des gleichen Gens entstehen, deren wichtigste SDF-1a (aus 89 Aminosäuren) und SDF-1 β (aus 93 Aminosäuren) sind. SDF-1 wird auf verschiedenen Endothelzellen exprimiert und bindet an den spezifischen G-Protein-Rezeptor, CXCR4. Später konnte ein zweiter Rezeptor, CXCR7, identifiziert werden. Der Rezeptor CXCR4, auch als Fusin oder CD184 beschrieben, befindet sich auf vielen Zellen des hämatopoetischen Systems, z.B. auf CD34-positiven Vorläuferzellen des Knochenmarks, Blutgefäßendothelzellen und Leukozyten. Er wird aber auch auf Zellen von Lunge, Leber, Skelettmuskeln, Hirn, Niere, Herz und auf Tumorzellen exprimiert.

Die Bindung des Liganden (SDF1- α) an den extrazellulären N-Terminus des Rezeptors (CXCR4) aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege (siehe Abb. 1) [Kucia et al. 2004]. So kommt es zum Calciumausstrom, Phosphorylierung der MAP-Kinase und Aktivierung der PI3/AKT/NF κ B-Achse sowie der MEK1/2/ERK1/2-Achse [Kucia et al. 2004 und 2005; Ho et al. 2010; Teicher et Fricker. 2010]. Die Funktionen Zellbewegung, Chemotaxis, Sekretion und Adhäsion werden darüber reguliert. Die durch SDF-1 aktivierten Zellen zeigen eine erhöhte Zelladhäsion via ICAM-1, VCAM-1 und Fibronectin, welche durch aktivierte Integrine erfolgt [DeFalco et al. 2004].

Die Bildung und Sekretion von SDF-1 wird häufig durch proinflammatorische Stimuli wie TNFa, Lipopolysaccharide oder IL-1, aber auch durch aktivierte Lymphozyten induziert [Shirozu et al. 1995; Kucia et al. 2004]. Aber auch Ischämie (wie Myokardinfarkt; Beinischämie etc.) triggert die Expression und Sekretion von SDF-1 [Askari et al. 2003; Ceradini et al. 2004; DeFalco et al. 2004]. Dabei führt ein erhöhter SDF-1-Spiegel zum vermehrten Homing von Stamm- und Progenitorzellen und verstärkt damit primär die EPC-induzierte Neovaskularisation [Askari et al. 2003; Yamaguchi et al. 2003]. Während einer Hypoxie reguliert der Transkriptionsfaktor HIF-1 α die Genexpression von SDF-1 in Endothelzellen des ischämischen Gewebes hoch [Ceradini et al. 2004]. SDF-1 und seine proangiogenen Effekte werden unter anderem durch einen HO-1-abhängigen Mechanismus via Proteinkinase-C- ζ -abhängigen und VEGF-unabhängigen Mechanismus in Endothelzellen vermittelt [Deshane et al. 2007]. Andererseits führt auch die Vorbehandlung von ex vivo EPCs mit SDF-1 zur verbesserten Rekrutierung dieser Zellen, die dadurch eine verstärkte Neovaskularisation in adulten Organismen hervorrufen [Yamaguchi et al. 2003].

SDF-1 kann EPCs in vitro zur Bildung von einfachen Gefäßformation anregen und unter Scherkraftbedingungen zeigen SDF-1 behandelte EPC eine festere Adhäsion [Zemani et al. 2008].

Das Protein reguliert die Chemotaxis und auch Adhäsion von Stamm- und Progenitorzellen in hypoxischen Geweben. Grunewald et al. beschrieben 2006 eine durch SDF-1 vermittelte perivaskuläre Lokalisation akzessorischer Zellen in Angiogenese-aktiven Gefäßen. Die Sekretion von SDF-1 erfolgte hierbei durch VEGF-induzierte perivaskuläre Myofibroblasten. EPC können SDF-1 exprimieren und autokrin sekretieren.

Weiterhin kann SDF-1 die Induktion der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in EPC hervorrufen, die neue vaskuläre Strukturen bilden können [DeFalco et al. 2004].

In der frühen Embryogenese, insbesondere der Organogenese, ist SDF-1 besonders für das zielgerichtete Wandern der Stammzellen aus der fetalen Leber zu ihren Bestimmungsorten (Knochenmark, Herz, Nervensystem) von Bedeutung [McGrath et al. 1999; Kucia et al. 2004]. Ein Defekt des SDF-1-Gens führt zur Letalität des Embryos [DeFalco et al. 2004]. Die Regulation der Hämatopoese und die Migration hämatopoetischer Zellen in die Blutzirkulation wird durch das Chemokine SDF-1 mit vermittelt [Kucia et al. 2005; Broxmeyer. 2008]. Effekte auf Zellüberleben und -proliferation werden bei SDF-1 kontrovers diskutiert, wobei Kucia et al 2004 dies bzgl. hämatopoetischer Stammzellen durchaus in Erwägung brachte.

Während der Inflammation kommt es durch SDF-1-Induktion zur Chemotaxis auf Lymphozyten, die den CXCR4-Rezeptor präsentieren [Kucia et al. 2004].

Inaktiviertes SDF-1 entsteht durch die Abspaltung von Peptiden am N-Terminus durch die Exopeptidasen MMP-2 [McQuibban et al. 2001] oder CD26/Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) [Christopherson et al. 2002]. Inaktives SDF-1 kann somit nicht mehr an seinem Rezeptor CXCR4 binden und die chemotaktische Wirkung entfalten. MMP-2 wird im extrazellulären Raum exprimiert und DPP-IV kommt auf verschiedenen Leukozyten und auch auf Endothelzellen vor. Durch die Spaltung von SDF-1 in Zielgeweben wird so der inflammatorische Reaktion entgegengewirkt, aber auch der Chemotaxis von Vorläuferzellen zur Neovaskularisation. Segers et al. konnten 2007 eine gegenüber MMP-2 und DPP-IV resistente Mutante von SDF-1 im Myokard exprimieren, die eine verbesserte

Rekrutierung von CXCR4-positiven Zellen und somit eine verbesserte Herzfunktion nach Infarkt induzierte. Wird DPP-IV pharmakologisch blockiert, wird eine Stabilisierung von aktivem SDF-1 im Zielgewebe erzeugt und kann somit eine verstärkte Rekrutierung von CXCR4-exprimierenden Zellen hervorrufen [Zaruba et al. 2009].

SDF-1 ist jedoch nicht nur an physiologischen Prozessen beteiligt, sondern auch in pathogenen Prozessen des Tumorwachstums, der Tumorangiogenese und der Metastasierung [Kucia et al. 2004; Kucia et al. 2005; Kryczek et al. 2007; Teicher et Fricker. 2010].

SDF-1 ist das dominierende Chemokin, das zur hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellmobilisierung sowie dem Homing via Adhäsion über seinen Rezeptor CXCR4 beiträgt. Dabei verstärkt es die EPC-induzierte Angiogenese und Gewebsregeneration. Für die Vaskulogenese stellt SDF-1 somit auch ein Schlüsselprotein dar.

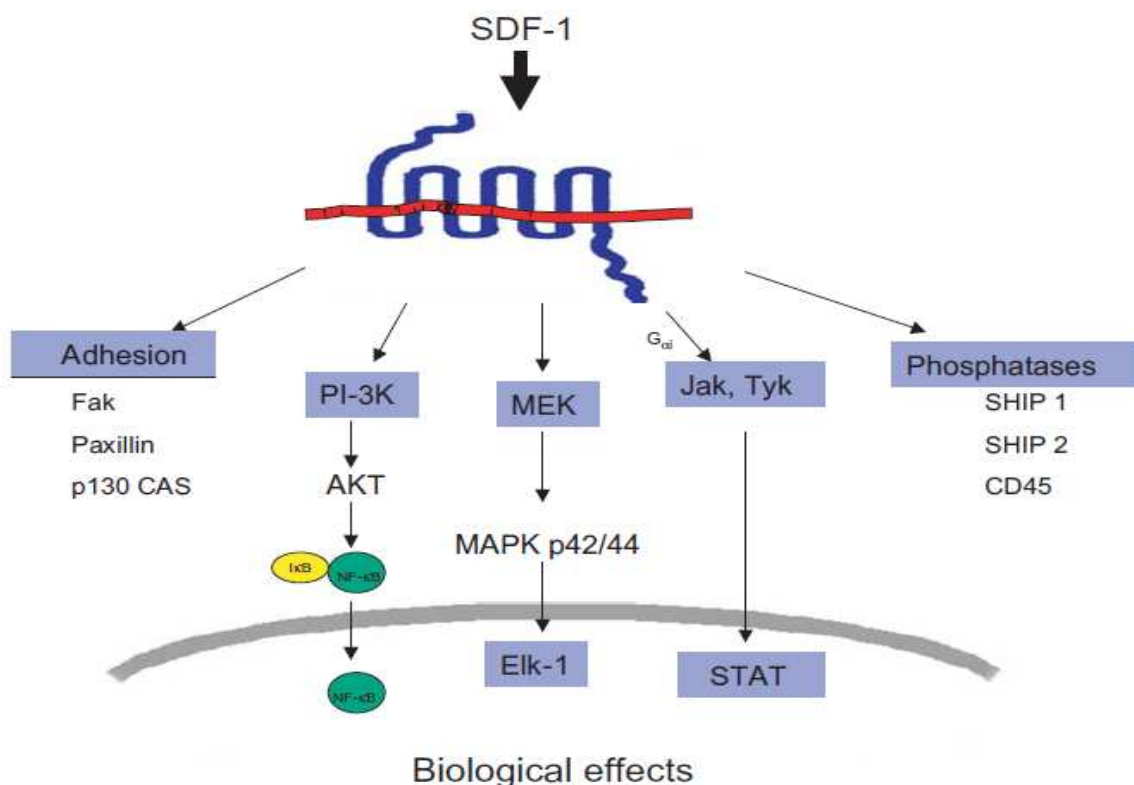


Abb. 1: Signaltransduktionswege der SDF-1/ CXCR4-Achse: SDF-1 tritt in Interaktion mit seinem Rezeptor CXCR4, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptorprotein, sodass intrazellulär verschiedene Signalwege aktiviert werden, die die Bewegung/Migration, Chemotaxis, Adhäsion und Sekretion sowie Proliferation und Überleben CXCR4-positiver Zellen reguliert (nach Kucia et al. 2004).

1.5.2. *Fractalkine – CX3CL1*

Das Chemokin Fractalkine (CX3CL1), auch Neurotactin (in Mäusen) genannt, gehört als einziges Mitglied zur CX3C Familie [Bazan et al. 1997]. Das Chemokine besteht aus einer Chemokine-Domäne an der Spitze, die über einen mucin-ähnlichen Proteinstrang exprimiert und einen GPI-Anker fest in der Zellmembran verankert ist. Dieses Molekül besteht aus 373 Aminosäuren und ist auf Chromosom 16, bei Mäusen auf Chromosom 8 und 11 kodiert [Bazan et al. 1997; Rossi et al. 1998]. Fractalkine ist an inflammatorischen Prozessen wie der Arteriosklerose, rheumatoiden Arthritis, renalen Erkrankungen wie Glomerulonephritiden oder auch an kardiovaskulären Erkrankungen involviert. Es kommt in 2 Formen vor: membrangebunden und löslich als 96kDa großes Glykoprotein [Bazan et al. 1997]. Dabei haben die 2 verschiedenen Formen wiederum verschiedene Eigenschaften. Das lösliche Fractalkine hat ein hohes chemoattraktives Potential für T-Zellen und Monozyten, das deren Migration bewirkt [Umehara et al. 2003]. Dagegen wirkt die membrangebundene Form auf aktivierten Endothelzellen und vermittelt dort ein Erfassen und eine starke Adhäsion (engl.: firm adhesion) nachfolgender Leukozyten [Bazan et al. 1997; Fong 1998; Chandrasekar. et al. 2003; Umehara et al. 2003]. Fractalkine ist das einzige Chemokine, das sowohl Chemotaxis/ Migration vermittelt als auch als Adhäsionsmolekül fungiert.

Imai et al. beschrieben erstmals 1998 den Fractalkine spezifischen Rezeptor CX3CR1, der eben genau diese Funktion der Leukozytenmigration und auch der Adhäsion unter physiologischen Flussbedingungen vermittelt. Dieser Rezeptor ist ein pertussis-toxin sensitives, 7 transmembraner G-Protein und kann eine Adhäsion ohne die Anwesenheit anderer Adhäsionsmoleküle (z.B. Integrine, VCAM-1 oder ICAM-1) vermitteln. Der Rezeptor CX3CR1 weist eine hohe Affinität und Stabilität zu seinem spezifischen Liganden CX3C auf, sodass ein direkter Effekt auf Adhäsion und Migration von Monozyten, NK-Zellen sowie T-Lymphozyten entsteht [Imai et al. 1998; Fong et al. 1998; Umehara et al. 2003]. Der Rezeptor wird vor allem auf zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert. Leukozytenrekretierung durch Fractalkine wird aber auch unter erhöhten Flussbedingungen via Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion induziert [Schulz et al. 2008]. Aktivierte Thrombozyten vermitteln hier mit Fractalkine eine lokale

Leukozytenakkumulation unter hohen Scherkraftbedingungen. Auch hier konnte der direkte Einfluss von Fractalkine auf das Erfassen von Leukozyten und eine feste Adhäsion nachgewiesen werden.

Fractalkine wird vermehrt auf Endothelzellen und auch glatten Muskelzellen durch den Stimulus via proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1, LPS oder Interferon- γ präsentiert [Imaizumi, Yoshida et Satoh. 2003; Chandrasekar et al. 2003]. Auf glatten Muskelzellen erfolgt die Fractalkine-Expression durch TNF α -induzierte NF κ B-Aktivierung. Zusätzlich kann Fractalkine seine eigene Expression via PI3/ AKT und NF κ B-Aktivierung sowie die Zell-Zell-Interaktion von glatten Muskelzellen und Proliferation induzieren [Chandrasekar et al. 2003].

Im Prozess der Angiogenese konnte Fractalkine auch als eines der wichtigeren Chemokine identifiziert werden. Lee et al konnten 2006 zeigen, dass Fractalkine über die Aktivierung des Raf-1/MEK/ ERK- und des PI3K/ AKT/ eNOS-Signaltransduktionswegs Angiogenese stimuliert. In vitro konnte hier eine Proliferation, Migration und Gefäßformation von HUVECs durch Fractalkine und eine in vivo Stimulation der Angiogenese gezeigt werden. Die Induktion von HIF-1 α und VEGF-Expression durch Fractalkine/ CX3CR1-Aktivierung auf Gefäßendothelzellen konnte eine nachfolgende VEGF/ KDR-vermittelte Angiogenese verstärken [Ryu et al. 2008].

1.5.3. Glycosylphosphatidylinositol-Anker - GPI-Anker

GPI-Anker sind membrangebundene Proteine, die auf allen Eukaryoten vorkommen und die Aufgabe haben, Oberflächenproteine über deren C-Terminus an der extrazellulären Plasmamembran fest zu verankern. Seit den 1970iger Jahren entwickelte unter anderen Low das Konzept von Ankerproteinen in der Membran, die an ein Phosphatidylinositol kovalent gebunden sind [Low 1987]. Seit den 1980igern wurden Strukturen, Synthese und Funktionen der GPI-Anker erforscht. Dabei sind GPI-Proteine in membranassoziierten Enzymen, Adhäsionsmolekülen, Differenzierungsmarker und anderen Glykoproteinen integriert, so z.B. in: Alkalische Phosphatase, Acetylcholinesterase, Carboanhydrase oder CD14 und CD 18 [Low.

1987; Brown et Waneck. 1992; Medof et al. 1996; Hoessli et Robinson. 1998].

Diese Proteine haben keine Transmembrandomäne und keine zytoplasmatischen Anteile. Jedoch werden alle GPI-Anker initial mit einer transmembranen Domäne synthetisiert, die im endoplasmatischen Retikulum während der Translation wieder abgespaltet werden [Brown et Waneck. 1992; Medof et al. 1996; Ferguson 1999]. Alle GPI-Proteine haben einen hochkonservierten Kern gemeinsam. Die große Variabilität der GPI-Ankerproteine entsteht durch die verschiedene Anzahl und Positionen der Mannosereste bzw. des Inositolrings. Die Struktur des GPI-Ankers setzt sich zusammen aus einer Phosphatidylinositolgruppe (PI), einem Saccharidkern (Ethanolamin-PO₄-Man- α 1-2 Man- α 1-6-Man α 1-4-GLcNH₂-) und dem betreffenden Protein. Dabei wird das jeweilige Protein über dessen C-Terminus über den letzten Mannoserest des hochkonservierten Saccharidkerns über eine Ethonalamingruppe gebunden [Homans et al. 1988; Medof et al. 1996]. Dieser Kern besteht aus einer Glucosamingruppe, die mit einer Phosphatidylgruppe an 3 Mannoseresten gekoppelt ist.

GPI-Anker-Proteine gestalten nicht nur die Zelloberfläche durch die feste Verankerung dieser Proteine in der Zellmembran. Über GPI-Anker kann auch eine verbesserte Beweglichkeit von verschiedenen Proteinen auf der Zellmembran erreicht werden. Weiterhin kann durch GPI-Proteine über verschiedene Membrankomponenten und Kofaktoren eine Unterstützung des zellulären Transports, der T-Zellaktivierung und der Signalübertragung erfolgen [Hoessli et Robinson. 1998]. GPI-Ankerproteine tragen zur Identifizierung der Zelle, insbesondere der Antigenbildung und -präsentation via MHC-I auf der Membran, bei [Brown et Waneck. 1992; Ferguson 1999]. Weiterhin sind GPI-Anker bei der Komplementregulation, der Proteolyse von extrazellulärer Matrix und bei der Myelin-Biosynthese und Prion-Pathogenese involviert [Hoessli et Robinson. 1998]

2. Zielsetzung der Arbeit: Verbesserung der Rekrutierung von eEPCs in ischämischen Geweben

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung geprüft, ob S1FG (SDF-1-
Fractalkine-GPI), ein Fusionsmolekül aus einem SDF-1-Chemokin, ein Fractalkine-
Schiff und einem GPI-Anker, die Adhäsion von endothelialen Progenitorzellen in
vitro und in vivo erhöht.

In einem zweiten Schritt wurden die Auswirkungen von S1FG auf die therapeutische
Neovaskularisation (Angiogenese, Arteriogenese und Perfusion) untersucht.

3. *Material und Methoden*

Anhand der Vorstellung, dass ein modifiziertes Adhäsionsmolekül eine stärkere Adhäsionswirkung auf EPCs hat, musste dieses zunächst entwickelt werden. Dazu wurden die beschriebenen Chemokine SDF-1 und Fractalkine so modifiziert und in Vektoren kloniert sowie mit einem GPI-Anker versehen, dass dieses neue Konstrukt (S1FG) auf dessen Adhäsionswirkung von EPCs in vitro und in vivo getestet werden konnte.

3.1. *in vitro Methoden*

3.1.1. *Amplifizierung von humanen SDF-1 α aus dem pCMVsport6 –Vektor*

Zur Isolierung und Amplifizierung wurde das humane Gen SDF-1 α in dem Plasmid pCMV-sport6 von RZPD (Berlin) kommerziell erworben. Die den Vektor enthaltenden E.coli wurden mittels der 3-Ausstrich-Methode auf Ampicillin-enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen und über 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden danach entnommen und die DNA isoliert (E.Z.N.A.® Plasmid mini Kit, Omega bio-tek, Norcross, GA, USA). Anschließend erfolgte der Verdau eines Teil der isolierten DNA mit den Restriktionsenzymen Xba I und EcoR1 (Roche, Mannheim) bei 37°C für eine Stunde und Größenüberprüfung auf ein 2%igen Agarosegel (SeaKem LE Agarose, Lonza, Köln). Die isolierte, nicht verdaute DNA wurde weiter zur Amplifizierung des SDF-1 α mittels Polymerase-Ketten-Reaktion genutzt. Die PCR erfolgte in einem Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg) mit folgenden Komponenten in einem 20 μ l Volumen: 1 μ l DNA, je 1 μ l der Primer, 2 μ l 10-fach Polymerase-Puffer, 1,25 μ l Mg; 4 ml dNTPs (1:4), 0,3 μ l Taq-DNA-Polymerase (BioLabs, Frankfurt am Main) und 9,5 ml PCR-Wasser. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 30 sec bei 95°C; 30 sec bei 60°C, 30 sec bei 72°C. Nach 35 Zyklen wurde die Reaktion bei 72°C für 5 min beendet. Die verwendeten Primer waren Fv 5'- CGG AAT TCC CGC GCC ATG AAC GCC AAG - 3' und Rv 5'- GCT CTA GAC TTG TTT AAA GCT TTC TCC AGG-3' (Metabion, Martinsried). Das Amplifikationsprodukt (ca. 280 bp) wurde anschließend durch

Fraktionierung in der Elektrophorese (BioRad, München) auf einem 2%igem Agarose- Gel überprüft. Das amplifizierte SDF-1 α konnte aus dem Gel bei entsprechender Bande eluiert werden (NucleoSpin® Extrakt II, Macherey-Nagel, Düren). Durch die Amplifizierung enthielt die cDNA SDF-1 α nun überhängende Ende mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoR1 (zu Beginn des Gens, d.h. am 5'-Ende) und XbaI (am Ende des Gens, am 3'-Ende).

3.1.2. Klonierung des SDF-1 α in den pIRES2-Vektor

Die vorhandenen Vektoren pIRES2-IL-8-GPI bzw. pIRES2-IL-8-Fractalkine-GPI (Vektoren aus dem Labor von P. Nelson, München) wurden je mit den Restriktionsenzymen Xba I und EcoR1 (Roche, Mannheim) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach die Enzyme bei 65°C über 15 min inaktiviert. Mittels Elektrophorese (1%iges Agarose-Gel bei 80 V über eine Stunde) konnten entsprechend der DNA-Größe für das Gen IL-8 mit 220 bp und dem restlichen Vektor von ca. 5 kB fraktionierte DNA-Banden dargestellt werden. Die durch die Restriktionsendonukleasen EcoR1 und XbaI linearisierte Vektor-DNA konnte somit detektiert und aus dem Gel heraus gereinigt werden (NucleoSpin® Extrakt II, Macherey-Nagel, Düren). Die gewonnene lineare Vektor-DNA hatte dadurch am 3'-Ende eine EcoR1-Schnittstelle und am 5'-Ende eine XbaI-Schnittstelle.

Zum Dephosphorylieren des 5'-Endes wurde nun die Vektor-DNA zusammen mit einer Shrimp alkalischen Phosphatase (SAP, Roche, Mannheim) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend die SAP bei 65°C über 15 min inaktiviert.

Ligation: Durch die mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und XbaI behandelten DNA-Fragmente (Vektor und das amplifizierte SDF) konnten die überhängenden Enden passend ligiert werden (RapidDNA Ligation Kit, Roche, Mannheim). Dazu wurde ein Verhältnis Vektor zu Insert-DNA von 1:5 in einem 30 μ l Ansatz genutzt. Die Komponenten des Ligationsansatzes waren: 10 μ l amplifizierte SDF-DNA (Insert), 2 μ l Vektor-DNA, 15 μ l 2fach Ligations-Puffer und 3 μ l T4-DNA-Ligase. Dieser Ansatz inkubierte für 5 min bei Raumtemperatur.

Transformation: 10 µl des Ligationsansatzes wurden nun zu 50 µl chemisch kompetenter E.colis (OneShot® Top10 Competent Cells, Invitrogen, Darmstadt) gegeben und unter Hitzeschock (30 min auf Eis; 60 sec 42°C; 2 min auf Eis) transformiert. Die transformierten Zellen wurden in 1 ml antibiotikafreies SOC Medium gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach folgte die Ausplattierung auf Kanamycin-haltigem LB-Agar. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden einzelne Kolonien entnommen und die DNA isoliert (E.Z.N.A.® Plasmid mini Kit, Omega bio-tek, Norcross, GA, USA).

Zur Überprüfung der Ligation wurde die isolierte DNA mit den Restriktionsenzymen XhoI und Sall bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend folgte die fraktionierte Auftrennung der DNA nach Größe in der Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel.

Eine ausreichende Menge der ligierten DNA wurde durch einen 500 ml Mediumansatz und anschließender DNA-Isolierung mittels NucleoBond® PC 500 (Macherey-Nagel, Düren) erreicht. Die Sequenzierung der Vektoren S1G und S1FG führte die Firma MWG (Ebersberg) durch. Die Vektoren wurden für in vitro-Versuche eingesetzt.

3.1.3. Amplifizierung und Klonierung S1-FG in den Vektor pCMVaavGFP

Für in vivo Versuche benötigte man das S1FG in einem anderen endothelgängigen Vektor (pCMVaavGPF). Dazu wurde S1FG aus pIRES2 mittels PCR durch folgendes Programm amplifiziert: 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 60°C, 30 sec bei 72°C. Nach 35 Zyklen wurde die Reaktion bei 72°C für 5 min beendet. Die verwendeten Komponenten auf ein Endvolumen von 50 µl bestanden aus: 1 µl DNA (S1FG im pIRES2), 5 µl Puffer, 4 µl dNTPs (1:4 verdünnt), 1µl PfuUltra-DNA-Polymerase (Stratagene, Waldbronn) je 1 µl Fv. und Rv-Primer (Fv 5'- GCG CGG CCG CGA ATT CCC CGC GCC ATG AAC G-3' und Rv 5'- CGG GAT CCG TCG ACT ATA ATA CAT TCA TAT AC-3'; Metabion, Martinsried) und 37 µl H₂O.

Nach Überprüfung des Amplifikationsproduktes durch Elektrophorese (zu erwartende Bande von 1100 bp) konnte dieses mit den Restriktionsendonukleasen NotI und

BamH1 (Fermentas, St. Leon-Rot) bei 37°C über eine Stunde verdaut werden, danach wurden die Enzyme durch 15 min Inkubation auf 65°C inaktiviert. Durch diesen Vorgang konnten überhängende Ende am S1FG Konstrukt mit Schnittstellen für NotI am 5'-Ende des Gen und für BamH1 sowie Sall am 3'-Ende hinzugefügt werden.

Der Vektor mit dem CMV-Promotor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NotI und BamH1 (Fermentas, St. Leon-Rot) für eine Stunde bei 37°C verdaut und anschließend die lineare und geschnittene Vektor-DNA auf ein 1%iges Agarose-Gel durch Elektrophorese aufgetrennt. Der Vektor konnte bei ca. 5 kB aus dem Gel isoliert werden (NucleoSpin® Extrakt II, Macherey-Nagel, Düren). Nun erfolgte die Ligation des S1FGs aus der PCR mit dem isolierten linearisierten Vektor unter Verwendung des RapidDNA Ligations Kit (Roche, Mannheim) mit anschließender Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente E.colis (Invitrogen, Darmstadt). Nach Inkubation im SOC-Medium bei 37°C konnten die transformierten E.colis auf Ampicillin-haltigen LB-Agar ausplattiert werden. Über Nacht wurden diese bei 37°C inkubiert, danach einzelne Kolonien entnommen und deren DNA isoliert (E.Z.N.A.® Plasmid mini Kit, Omega bio-tek, Norcross, GA, USA). Der Ligationserfolg wurde nach Verdau mit NotI und Sall (Roche, Mannheim) und Auftrennung auf ein 2%iges Gel überprüft und zur Sequenzierung an die Firma MWG (Ebersberg) geschickt. Die Menge der Vektor-DNA konnte mit einem 500 ml Mediumansatz und anschließender DNA-Isolierung mittels NucleoBond® PC 500 (Macherey-Nagel, Düren) gesteigert werden.

Der Vektor pCMV-S1FG wurde für die in-vivo-Versuche eingesetzt.

3.1.4. In vitro Überexpression von S1FG

Zum Nachweis der Überexpression wurden 293-Zellen (HEK-293, Invitrogen, Darmstadt) mit dem Konstrukt S1FG im pCMVaaV-GFP-Vektor und einem Kontrollvektor mittels Satisfection® (Chem-Agilent, Waldbronn) transfiziert. Es wurde nach 48 h die cDNA isoliert (Fermentas, St. Leon-Rot) und eine rt-PCR (MyiQ-iCycler; BioRad, München) unter Verwendung des iQ-SybrGreen® Supermix

(BioRad, München) und der Primer Fv 5'- GCG CGG CCG CGA ATT CCC CGC GCC ATG AAC G-3' und Rv 5'- CGG GAT CCG TCG ACT ATA ATA CAT TCA TAT AC-3' (Metabion, Martinsried) durchgeführt.

Medium: 293 Zellen DMEM (Biochrom AG, Berlin).

3.1.5. Membranfärbung von Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen

Für die Fluoreszenzmikroskopie mussten die eEPCs (T17-Zellen aus dem Labor von A. Hatzopoulos, München; Isolation der eEPCs nach Hatzopoulos et al. 1998) und Monozyten (THP1 aus dem Labor von P. Nelson, München) mit einem fluoreszierenden Oberflächenmarker zur Detektion markiert werden. Dazu verwendeten wir Dil (rot fluoreszierend; 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin- Perchlorat; MolecularProbes, Leiden, Niederlande) und CellTracker® Green BODIFY (grün fluoreszierend; 8-chloromethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; MolecularProbes; Leiden; Niederlande).

Die Zellen wurden mit je 15µl Farbstoff pro 1ml Medium und 1 Million Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach mit Medium gewaschen.

Medium:	eEPCs	ECGM (Provitro, Berlin)
	THP1	RPMI 1640 (PAA, Pasching, Österreich)

3.1.6. In vitro Adhäsionsversuche mit Monozyten und eEPC

Um die Adhäsion von Monozyten und eEPCs unter Scherspannung zu testen, wurden kultivierte und isolierte embryonale Rattenendothelzellen in Fibronectin beschichteten 1-Kanal-Flusskammern (µ-Slides I^{0,1} Luer; IBIDI, Martinsried; Abb. 2) über das rechte Reservoir in den Kanal der Flusskammer ausgesät (40000 bis 50000 Zellen in 100 µl pro Flusskammer). Die Flusskammer-Reservoirs wurden danach je mit 600 µl ECGM-Medium (Provitro, Berlin) gefüllt. Nachdem die Endothelzellen einen konfluierenden Zellrasen (Abb. 3) mit einer Dichte von ca. 70-80% gebildet

hatten, wurden diese mit verschiedenen Plasmiden (pIRES2 mit IL-8-GPI; IL-8-FG; IP10-GPI; IP10-FG; SDF-GPI oder S1FG sowie Wildtyp-Fractalkine; pCMVsport6-SDF-1 α) bzw. mit einem Kontrollvektor (pcDNA) liposomal transfiziert (Lipofectamine™; Invitrogen, Darmstadt).

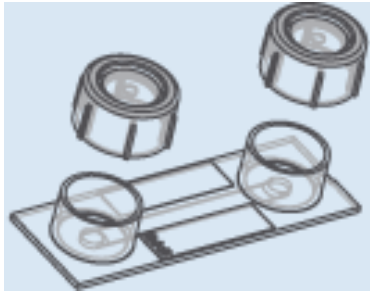


Abb. 2a



Abb.2b

Abb. 2a: Schematische Darstellung des μ -Slide I ^{0,1} IBIDI (Martinsried) für die Adhäsionsversuche
Abb. 2b: Beispiel eines mit Medium-gefüllten μ -slides

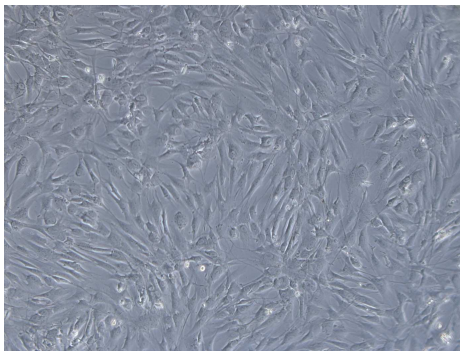


Abb. 3: Ratten-Endothel im μ -Slide

24 Stunden nach der Transfektion wurden 1 Million Dil-markierte Monozyten der Zelllinie THP1 (aus dem Labor von P. Nelson, München) bzw. 1 Million CellTracker®Green-markierte eEPCs (aus dem Labor von A. Hatzopoulos, München) für 10 min bei 4 ml/h über die transfizierten mit IL-1 β stimulierten Endothelzellen geleitet.

Dazu wurden beide fluoreszenzmarkierten und suspendierten Zelllinien in eine 50 ml-Perfusorspritze in 15 ml ECGM-Medium (Provitro, Berlin) aufgezogen, die dann in einen Perfusor befestigt wurde. Der μ -Slide wurde in dem Objekträgerhalter des Mikroskops befestigt. Die Verbindung der Perfusorspritze mit dem μ -Slide erfolgte durch einen Adapter und einer Perfusorleitung nach vorheriger Spülung mit DMEM-Medium am rechten Reservoir der Flusskammer. Dabei musste auf eine

luftblasenfreie Verbindung geachtet werden.

Am linken Reservoir wurde über ein Adaptersystem ein Perfusorschlauch für den Auslauf angeschlossen, damit die anfallende Medium-Zell-Suspension aus dem Slide abgeleitet werden konnte.

Die Flusskammern wurden nach der Perfusion mit PBS gespült und die adhärenen Monozyten bzw. eEPCs durch Fluoreszenzmikroskopie bei 10-facher Vergrößerung (Axiovert 100, Carl Zeiss AG, München) auf 10 Bildern pro μ -Slide aufgenommen und quantifiziert.

3.2. in vivo Methoden

Die dargestellten tierexperimentellen Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 211-2531-2531-82/02 und AZ 55.2-1-54-2531-67/07) und unterlagen dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Versuche wurden alle im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin durchgeführt.

3.2.1. Modell des ischämischen Hinterlaufs im Kaninchen

Mit dieser Methode soll im ischämischen Hinterlauf mittels xenogener Zelltherapie die Rekrutierung von murinen Vorläuferzellen mit und ohne S1FG Vorbehandlung sowie die daraus resultierenden therapeutischen angiogenen Effekte der xenogenen Vorläuferzellen untersucht werden.

Für alle Versuche wurden weiße Neuseelandkaninchen (weiblich; Charles River; Sulzfeld) mit einem Gewicht von ca. 3,0 kg ($\pm 0,4$ kg) verwendet.

An jedem Versuchstag wurden die Versuchstiere mit Rompun® (2mg/kg KG, Bayer, Leverkusen) und Ketamin® (50mg/kg KG, Braun AG, Melsungen) intravenös über eine Ohrvene narkotisiert [Pfosser et al. 2005]. Eine postoperative Analgesie erfolgte über die Gabe von Tramaldol im Trinkwasser für 3 Tage.

An den Tagen 0, 7 und 9 erhielt jedes Tier eine Antibiose von 8 mg Gentamicin (Delta select, Dreilich) intramuskulär in den linken Oberschenkel jeweils nach

Versuchsende und wurden wieder in den Tierstall gebracht, wo diese freien Zugang zu Futter und Wasser hatten.

Der Versuch des ischämischen Hinterlaufs im Kaninchen erstreckte sich über insgesamt 11 Tage für die in vivo Zelladhäsionsnachweise (siehe 3.2.1.1.) und über 35 Tage für die Funktionsanalysen (siehe 3.2.1.2. und Abb. 4, Abb. 5).

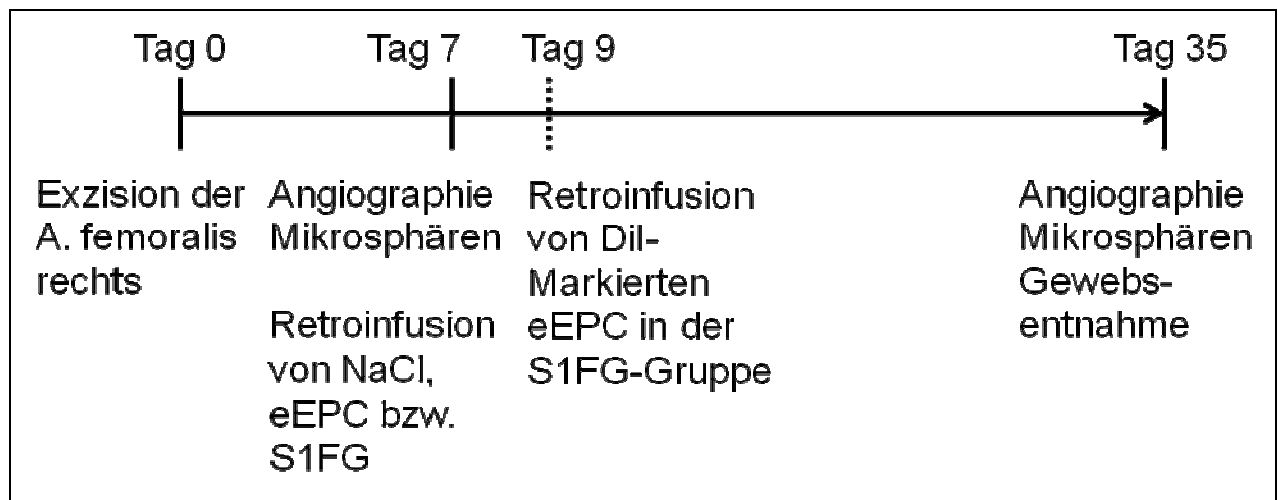


Abb. 4: Versuchsablauf des Modells des ischämischen Hinterlaufs im Kaninchen (Funktionsanalysen siehe 3.2.1.2.): In allen Gruppen (Kontrollen (NaCl), eEPC und S1FG + eEPC) wurde den Versuchstieren an Tag 0 die A.femoralis rechts exziiert. An Tag 7 wurde bei allen Tieren eine baseline-Angiographie der Hinterläufe durchgeführt und Mikrosphären (Farbe A) appliziert. Über V. tibialis anterior unter Blockierung des venösen Rückstroms durch temporäre V. femoralis-Ligatur wurde NaCl (Kontrollgruppe), 5 Mio. eEPC (EPC-Gruppe) bzw. 1mg liposomales S1FG (S1FG+ eEPC-Gruppe) retroinfundiert. Die S1FG-behandelte Gruppe erhielt 2 Mio. eEPC an Tag 9 zusätzlich via Retroinfusion und unter Verhinderung des venösen Rückflusses. An Tag 35 erfolgten in allen Gruppen erneut Hinterlaufangiographien und Mikrosphärengegabe, und schließlich Gewebsentnahmen.



Abb. 5: Darstellung des arteriellen Gefäßsystems des Kaninchens in der MRT-Angiographie am Tag 7 nach Exzision der A.femoralis rechts

Tag 0: Zur Erzeugung einer chronischen Ischämie erfolgte am Tag 0 bei allen Tieren die komplette Exzision der rechten Femoralarterie nach Hershey et al. 2001. Dazu wurde nach Rasur des rechten Unterschenkels und Desinfektion ein bogenförmiger Hautschnitt vom Leistenband bis zum Knie gesetzt. Unterhalb des Leistenbandes wurden nun die Abgänge der Femoralarterie, von proximal nach distal gehend, bis kurz unterhalb des Kniegelenks chirurgisch unter Schonung der Vena femoralis präpariert und mit 4,0 Seide (Perma Hand Seide, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Die nicht mehr ligierten Arterienanteile wurden in toto entfernt. Danach wurde die Wunde durch eine Einzelknopfnahnt verschlossen und ein Tape-Verband (Leukoplast hospital, BSN medical, Hamburg), angelegt, sodass die Kaninchen nicht an der Nahtwunde nagen und die Wunde aufbeißen konnten.

Tag 7: Nach obenstehender Narkoseeinleitung wurde am Tag 7 der venöse Rückfluss des operierten Hinterlaufs mit einer temporären Ligatur der Vena femoralis, die chirurgisch zuvor präpariert wurde, für 20 min blockiert. Es erfolgte währenddessen die Retroinfusion von 5 Millionen murinen eEPCs in einem Volumen von 5 ml DMEM-Medium (eEPC-Gruppe) bzw. 1 mg liposomaler S1FG cDNA in einem Volumen von ca. 8 ml (S1FG +eEPC-Gruppe) über eine 24G-Braunüle (Braun AG, Melsungen) in die Vena tibialis anterior des ischämischen Hinterlaufs [Lebherz et al. 2003; Pfosser et al. 2005]. Für die in vivo Transfektion von S1FG wurde Effectene® (Qiagen, Hilden) verwendet. Der Ansatz wurde aus folgenden Komponenten hergestellt: 1 mg S1FG wurde mit 4 ml PBS gemischt und dann wurden 4 ml Puffer hinzugefügt. Nach 2 min wurden 200 µl Enhancer und nach

weiteren 5 min 250 µl Effectene-Transfektionsreagens dem Transfektionsansatz hinzugefügt, dabei war darauf zu achten, dass die liposomal verpackte DNA nicht flockig ausfällt. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe erhielt 6 ml NaCl 0,9% via Retroinfusion.

Tag 9: 48 Stunden nach der S1FG Behandlung wurde in der nur in der S1FG + eEPC-Gruppe erneut eine temporäre Ligatur der proximalen Femoralvene für 20 min durchgeführt und 2 Millionen murine eEPCs in 5 ml DMEM-Medium durch Retroinfusion in die V. tibialis anterior appliziert [Kupatt et al. 2005].

Tag 11 bzw. Tag 35: Am letzten Tag des Versuchs, Tag 11 bei den Zelladhäsionsnachweistieren bzw. Tag 35 bei den Langzeitversuchstieren, erfolgte nach Versuchsabschluss eine intrakardiale Injektion von hochprozentigem Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe), anschließend die Entnahme von Geweben (alle Muskeln des ischämischen und nichtischämischen Hinterlaufs: M. fibularis; M. gastrocnemius; M. tibialis anterior; M. vastus medius; M. adductus; sowie die Organe: Milz, Leber, Lunge, linker Ventrikel des Herzes, beide Nierenoberpole). Diese Proben wurden in flüssigem Methylbutan (Roth, Karlsruhe) für 10 min schockgefroren und für histologische Analysen bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.1. In vivo Zelladhäsion im Gewebe des Hinterlaufs

In Kurzzeitversuchen, die insgesamt über 11 Versuchstage gingen, wurde die Rekrutierung von murinen eEPCs 48 h nach deren Retroinfusion im Gewebe analysiert. Für die Detektion wurden jeweils 3 Tiere der nur eEPC-behandelten Gruppe und der S1FG behandelten Gruppe untersucht.

Am Tag 0 erfolgte die Exzision der Femoralarterie wie oben beschrieben.

Tag 7: Es wurden 5 Millionen Dil-markierte murine eEPCs in 5 ml Medium (Kupatt et al. 2005 und 2010) bzw. 1 mg liposomale S1FG-cDNA in 8 ml Transfektionsansatz (Effectene®, Qiagen, Hilden; Pfosser et al. 2005) über eine 24G-Braunüle in die Vena tibialis anterior rechts retroinfundiert bei gleichzeitiger Blockierung des venösen Rückstaus durch Ligation der proximalen V.femoralis rechts für 20 min.

Tag 9: Bei den S1FG vorbehandelten Tieren wurden durch eine erneute Retroinfusion 5 Millionen Dil-markierte murine eEPCs (in 5 ml Medium) über eine 24G-Braunüle in die Vena tibialis anterior rechts appliziert mit Unterbrechung des venösen Rückstaus für 20 min durch Ligation der proximalen V. femoralis.

Ende des Versuchs: In den Zellaufweisversuchen war 48 h nach Retroinfusion von eEPCs (Tag 9 in der eEPC-Gruppe und Tag 11 in der S1FG+ eEPC-Gruppe) der Endpunkt des Versuchs erreicht. Es erfolgte die Entnahme von Muskel- und Organproben, die in flüssigem Methylbutan schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

Die Muskeln und Organe konnten nun im Kryotom (Leitz, Wetzlar) in 5 µm dicken Schnitten auf Objektträger fixiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Muskeln quer zum Muskelfaserverlauf geschnitten wurden.

In der Fluoreszenzmikroskopie (AxioVert 100; Carl Zeiss AG, München) wurde ein N2 Filter Block (Exzitation: 530 bis 560 nm; Emission: >580nm) bei 10- bzw. 40-facher Vergrößerung zur Detektion der Dil-markierten eEPCs verwendet. Pro Tier erfolgte exemplarisch die Quantifizierung von Dil-markierten eEPCs pro Sichtfeld in den Unterschenkelmuskeln M. fibularis und M. gastrocnemius sowie im Oberschenkelmuskel M. adductus (je 10 Bilder pro Muskel und Tier).

3.2.2. Langzeitversuche: Kollateralwachstum, Perfusion und Kapillardichte

Es wurden insgesamt 3 Gruppen gebildet. In der Kontrollgruppe waren 6 Tiere, die mit NaCl behandelt wurden. Die Gruppe, die mit 5 Millionen eEPC via Retroinfusion am Tag 7 behandelt wurden, bestand aus 5 Tieren. 5 weitere Kaninchen erhielten eine S1FG-Transfektion mittels Retroinfusion am Tag 7 und 48 Stunden danach 2 Millionen eEPCs ebenfalls via Retroinfusion.

Der Versuchsablauf erfolgte wie oben beschrieben: Tag 0 induzierte man eine Ischämie durch komplette Exzision der rechten A. femoralis.

Am Tag 7 erfolgte in allen 3 Gruppen eine Angiographie der Hinterläufe beidseits. Dazu wurde die rechte A. carotis frei präpariert und ein 4F Katheter (Cordis, Haan)

proximal des Leistenbandes in die A. iliaca communis rechts bzw. links platziert. Danach erfolgte auf jeder Seite die Injektion von 2 ml/sec Kontrastmittel (insgesamt 4 ml pro Hinterlauf; Solutrast 370; Byk Gulden, Konstanz) über eine automatische Einspritzpumpe (Harvard Apparatus, Freiburg) und unter Röntgendurchleuchtung (Ziehm, Nürnberg; [Lebherz et al. 2003; Pfosser et al. 2005; Kupatt et al. 2005]). Dabei wurden 25 Angiographie-Bilder pro Sekunde (= Frames) erstellt und für die späteren Analysen gespeichert.

Nach Durchführung der Angiographien erhielten die Tiere der einzelnen Gruppen ihre Behandlung durch Retroinfusion wie bereits oben beschrieben: die eEPC Gruppe je 5 Millionen murine eEPCs bzw. in der S1FG-Gruppe 1 mg liposomal verpacktes S1FG über die rechte V. tibialis anterior und unter temporärer Ligation der proximalen V. femoralis für 20 min.

Am Tag 9 wurden in der S1FG-Gruppe 2 Millionen eEPCs über die rechte V. tibialis anterior retroinfundiert unter gleichzeitiger Unterbindung des venösen Rückflusses wie oben beschrieben.

28 Tage nach Retroinfusion von eEPCs, S1FG bzw. NaCl in der Kontrollgruppe (Tag 35) wurde der Versuch beendet. Bei allen Tieren in der Langzeitversuchsreihe wurde erneut Angiographien der Hinterläufe durchgeführt. Dazu wurde ein 4F-Katheter über die linke chirurgisch präparierte A. carotis bis in die A. iliaca communis rechts bzw. links platziert und 2 ml/sec Kontrastmittel (Solutrast 370, Byk Gulden, Konstanz) über die automatische Einspritzpumpe appliziert und 25 Angiographie-Bilder pro Sekunde bei der Röntgendurchleuchtung (Ziehm, Nürnberg) erstellt und für die weiteren Analysen gespeichert.

Nach intrakardialer Injektion von hochprozentiger Kaliumchloridlösung (Roth, Karlsruhe) wurden die Muskeln des ischämischen und des kontralateralen Hinterlaufs sowie Organe entnommen und schockgefroren und bei -80°C eingefroren.

3.2.2.1. Kollateralwachstum

Die gespeicherten Angiographie-Bilder der Hinterläufe wurden zur Bestimmung des Kollateralwachstums benutzt. Dazu wurden repräsentative Bilder aus den Angiographien der Tage 7 und 35 der ischämischen und nichtischämischen

Hinterläufe jedes Tieres ausgewählt und die Anzahl der angiographisch sichtbaren Gefäße im Bereich der Femoralarterie (vom Leistenband bis zum Kniegelenk), die ein darübergerlegtes Gitternetz kreuzen, gezählt [Arras et al. 1998]. Die Anzahl der kreuzenden Gefäße vom Tag 35 wurden ins Verhältnis zu der Anzahl am Tag 7 gesetzt und stellt das Maß des Kollateralwachstums (in % an Tag 7) dar.

3.2.2.2. *Perfusion - Cinedensometrie*

Zur quantitativen Analyse der Einschätzung des Blutflusses wurde die etablierte Methode der Cindensometrie genutzt (nach Swanson et al. 1983; Gibson et al. 1996; Dorsaz et al. 1997). Dazu wurden repräsentative Angiographie-Bilder, an denen das Kontrastmittel das Leistenband bzw. das Kniegelenk erstmalig überquert, bestimmt und die Anzahl der Frames vom Leistenband bis zum Kniegelenk gezählt. Da die Perfusionsgeschwindigkeit des Kontrastmittels indirekt proportional zur Frame-Anzahl ist und die Frames des ischämischen Hinterlaufs durch den nicht ischämischen Hinterlauf normiert werden, wurde das Ergebnis des Blutflusses entsprechend des Verhältnisses der Frames abgeschätzt (Anzahl der Frames nichtischämisch: Anzahl der Frames ischämisch in %). Die Änderung der Frame-Anzahl von Tag 35 wurde in Prozent zu Tag 7 angegeben [Lebherz et al. 2003].

Frame count score = frame count (nicht ischämischer Hinterlauf) / frame count (ischämischer Hinterlauf).

3.2.2.3. *Regionaler Blutfluss - Mikrosphären*

Zur Blutflussbestimmung wurde eine zweite Methode, die Mikrosphärenmessung, vor allem für die Quantifizierung des regionalen Blutflusses genutzt. Für die regionale Perfluationsbestimmung wurden am Tag 7 und Tag 35 Mikrosphären ($1,0 \times 10^6$, Invitrogen, MolecularProbes, Eugene, Oregon, USA) unterschiedlicher Farben in den linken Ventrikel appliziert und nach Beendigung des Versuchs die Muskelproben auf Mikrosphärenfluoreszenz untersucht.

Zur Injektion dieser fluoreszierenden Partikel wurde ein 4 F Katheter direkt in den linken Ventrikel am Tag 7 und Tag 35 vorsichtig platziert, so dass keine ventrikulären Rhythmusstörungen ausgelöst wurden. Die Injektion erfolgte in einem Zeitintervall von 3 min unter gleichzeitigem Referenzabzug über die Ohrarterie (Abzugsrate 3,24 ml/ min über 22G-Braunüle (BraunAG, Melsungen) durch eine 33-Syringe Pumpe FMI, Egelsbach; Tag 7 und Tag 35). Diese Referenzblutproben wurden in einem Filter (B in Abb. 3) bis zur abschließenden Analyse bei 4°C dunkel gelagert [Thein et al. 2002].

Am Tag 35 wurden zusätzlich zu den Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen weitere Proben der genannten Muskeln des ischämischen und nichtischämischen Hinterlaufs (M. fibularis; M. tibialis, M. gastrocnemius, M. adductus und M. vastus medius) entnommen und in 4% Formalin (Roth, Karlsruhe) fixiert.

Für die Analysen des regionalen Blutflusses wurden die entnommenen und in Formalin gelagerten Proben in 1,5 bis 2,5 g große Stücke geschnitten und in den Filter B (siehe Abb. 6) des SPU-Systems verbracht [Raab et al. 1999]. Das SPU-System besteht aus 3 Untereinheiten: dem Filter (B in Abb. 6), dem Filterhalter (C in Abb. 6) und dem Probenröhrchen (D in Abb. 6), das System kann mit den Deckeln A und E (Abb. 6) verschlossen werden. Das System ist aus Polypropylen, der Filter hat eine Porengröße von 7 µm, die fluoreszierende Mikrosphären von über 15 µm Durchmesser zurückhalten.

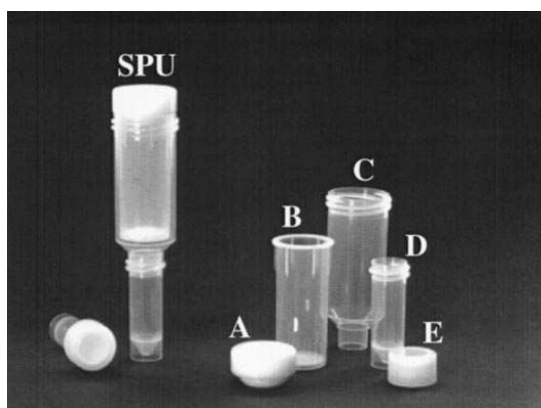


Abb. 6: Gefäße des SPU-System zur Aufbereitung von Proben zur Mikrosphärenmessung nach Raab et al. 1999

Im Filter B findet der Verdau, die Filtration, das Waschen und die Farbextraktion der Proben statt [Raab et al. 1999; Thein et al. 2000 und 2002].

Der Verdau der Proben erfolgte automatisch in einem modifizierten Roboter (Zymark, Idenstein) nach Thein et al. (2000). Dazu wurden zu jeder Probe 15 ml Verdauungslösung (4 M KOH, Merck, Darmstadt; mit 0,2% Tween80, Roth, Karlsruhe) hinzugegeben und mit 3 ml 100% igem Ethanol (Roth, Karlsruhe) luftdicht abgedeckt und anschließend mit einem Deckel verschlossen. Damit wurde zusätzlich die Kristallisation der Proben durch KOH verhindert. Der Zusatz von Tween80 verhinderte das Anhaften der Mikrosphären an den Behälterwänden. Die so angesetzten Proben wurden nun für 24 Stunden bei 60°C in einem Wärmeblock (Perkin Elmer, Überlingen) verdaut. Anschließend wurde das KOH durch den Filter abgesaugt und der Rest der Lösung vorsichtig mit PBS gewaschen und neutralisiert. Die so vorbehandelten Filter B und die Filter der Referenzblutabzüge Tag 7 und Tag 35 wurden nun wieder in das SPU-System gesteckt und zum Auflösen 2 ml Cellsolv-Lösung (= Ethoxyethylacetat, Sigma, Deisenhofen) hinzugegeben. Der Farbstoff der Mikrosphären wurde so herausgelöst und für 3 min abzentrifugiert (3000 Umdrehungen/ min). Je 100 µl des in Ethoxyethylacetat gelösten Farbstoffs aus dem Röhrchen D pro Probe wurden zur Quantifizierung auf eine 96-well-Platte pipettiert und die Fluoreszenz automatisch über einen Mikroplattenleser (Tecan Safire 2, Crailsheim) gemessen.

Der regionale Blutfluss wurde als Verhältnis der Fluoreszenz des ischämischen Hinterlaufs zum nichtischämischen Hinterlauf zwischen Tag 35 zu Tag 7 bestimmt.

3.2.2.4. *Kapillarwachstum*

Zur quantitativen Bestimmung des Kapillarwachstums wurde die Kapillardichte in den Unterschenkelmuskeln der jeweiligen Gruppen bestimmt.

Nach Beendigung des Versuchs am Tag 35 und Entnahme der Muskeln konnten nun im Kryotom (Leitz, Wetzlar) 5 µm dicke Schnitte der gefrorenen Muskeln angefertigt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Muskeln quer zum Muskelfaserverlauf geschnitten und so auf Objektträgern fixiert wurden.

Es wurden die Unterschenkelmuskeln M. fibularis, M. gastrocnemius und M. tibialis verwendet.

Die Schnitte wurden mit einer Färbung gegen alkalische Phosphatase, einem Endothelzellmarker (siehe 3.2.2.4.1) und mit einem Antikörper gegen CD-31 (siehe 3.2.2.4.2.) zur bestätigenden Endothelzellidentifikation gefärbt.

In 40-facher Vergrößerung (AxioVert 100, Carl Zeiss AG, München) wurden in jedem Muskel in 6 Bildern die Kapillaren und Muskelfasern pro Gesichtsfeld gezählt. Die Kapillardichte wurde entsprechend des Verhältnisses Kapillare zu Muskelfaser angegeben [Brown et al. 1988].

3.2.2.4.1. Alkalische Phosphatase – Färbung (AP)

Für die Bestimmung der Kapillardichte wurden die Kapillarendothelzellen mit einer Färbung gegen die alkalischen Phosphatase, einem Endothelzellmarker, gefärbt. In einer modifizierten Methode nach Ziada et al (1984) wurden die Muskelschnitte auf den Objektträgern mit einer Lösung, in der 30 mg Nitrobluetetrazolium (Sigma, Deisenhofen) und 6 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (Sigma, Deisenhofen) gelöst wurden, eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Pufferlösung (30ml) besteht aus 6,9 M MgSO_4 (Merck, Darmstadt) und 27,5 M $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ (Merck, Darmstadt). Nach kurzem Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung für 5 min mit 4%igem Formaldehyd (Roth, Karlsruhe). Nach erneutem Waschen mit Aqua dest. erfolgte eine Gegenfärbung mit 0,1% Kernecht-Rot für eine Minute. Anschließend wurden die Schnitte nach letztmaligem Waschen mit Aqua dest. luftgetrocknet. Bis zur Mikroskopie wurden die Objektträger bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2.4.2. CD-31 – Färbung (PECAM-1)

Zur weiteren Bestätigung des Kapillarwachstums wurden die angefertigten Muskelschnitte immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen CD 31 (Kupatt et al. 2007) gefärbt. CD 31 (PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) ist ein Endothelzellmarker und befindet sich zusätzlich auf Lymphozyten, Makrophagen und Thrombozyten. Dadurch konnten Kapillaren im Muskel identifiziert werden.

Für die Färbung wurden die Muskelschnitte 20 min mit 2 molarer Salzsäure bei 38°C vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Blockierung der Peroxidase mit 1%igem Wasserstoffperoxid (Roth, Karlsruhe) für 15 min. In einem Verhältnis von 1:20 wurde der primäre CD-31 Antikörper (sc1505, SantaCruz, Heidelberg) auf die Muskelschnitte aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C und Waschen der Schnitte erfolgte die Inkubation der Schnitte mit einem sekundären Rhodamine-gekoppelten Antikörper (sc2094, SantaCruz, Heidelberg) im Verhältnis 1:50, jeweils bei Raumtemperatur für 2 Stunden und lichtgeschützt.

Nachdem der Überstand abgewaschen wurde und die Schnitte getrocknet waren, konnten nun rotfluoreszierende Endothelzellen der Muskelschnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie (AxioVert 100; Carl Zeiss AG, München) bei 40-facher Vergrößerung identifiziert, aufgenommen und ausgewertet werden.

3.2.3. SDF-1 – PECAM-1 – Färbung

Zum Nachweis der SDF-1-Expression im Gewebe erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen SDF-1 und gegen CD31 (PECAM-1) in Muskelproben (exemplarisch M. gastrocnemius) 4 Tage nach S1FG-Applikation.

Die angefertigten 5 µm dicken Muskelschnitte wurden zunächst mit 2 molarer Salzsäure über 20 min bei 38°C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte nun eine Inkubation der Schnitte in einprozentiger Wasserstoffperoxidlösung (Roth, Karlsruhe). Danach wurde auf die Schnitte der 1:20 verdünnte primäre CD-31 Antikörper (sc1505, Santa Cruz, Heidelberg) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C belassen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Rhodamine-gekoppelten sekundären Antikörper (1:50; sc2094, Santa Cruz, Heidelberg) bei Raumtemperatur und lichtgeschützt für 2 Stunden. Für die SDF-1-Färbung wurde danach ein primärer SDF-1-Antikörper (1:62, MAB 350, R&D Systems, Minneapolis, USA) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C erneut inkubiert. Ein zweiter sekundärer, jedoch nun FITC-konjugierter Antikörper (sc2099, Santa Cruz, Heidelberg) wurde im Verhältnis 1:50 auf die Schnitte aufgetragen und wiederum bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 2 Stunden zum Einwirken belassen. Nach Entfernen des Überstandes und Trocknen

der Schnitte konnten nun rotfluoreszierende Endothelzellen (CD31-positiv) und grünfluoreszierende Zellen (SDF-1-positiv) der Muskelschnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie (AxioVert 100; Carl Zeiss AG, München) bei 40-facher Vergrößerung identifiziert, aufgenommen und ausgewertet werden.

3.3. *Statistische Analysen*

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) und SPSS (SPSS 17 SPSS Inc., Chicago, USA) analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) dargestellt. Im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes nach dem Anova-Test wurde ein Gruppenvergleich mittels Student-Newman-Keuls-Prozedur durchgeführt.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Amplifizierung hSDF-1 α aus pCMV-Sport-6 (RZPD)

Nach PCR-Amplifizierung des SDF-1 aus dem pCMV-Sport-6-Plasmid von RZPD und Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Xba1 (Roche, Mannheim) konnte eine Bande von 287 Basenpaaren in der Gelelektrophorese (2%iges Laktulose Gel) nachgewiesen werden (Abb. 7).

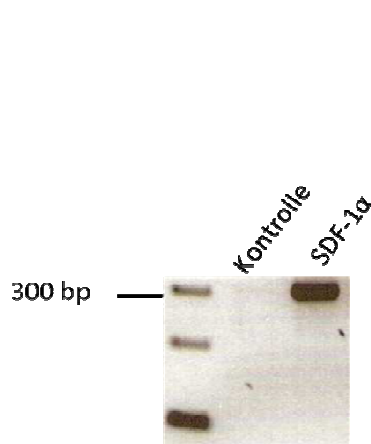


Abb. 7

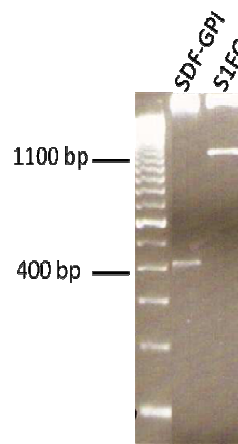


Abb. 8

Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte nach Verdau den Restriktionsenzymen mit EcoR1 und Xba1. Das SDF-1-Gen konnte bei einer Bande von ca. 300 bp detektiert werden.

Abb. 8: Gelelektrophorese nach Ligation SDF-1 mit pIRES2-GPI und pIRES2-Fractalkine-GPI nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Xho1 + Sall. Es waren die zu erwartenden Banden für pIRES2-SDF-1-GPI bei etwa 400 bp und für pIRES2-S1FG bei ca. 1100 bp nachweisbar.

4.2. Ligation hSDF-1 mit pIRES2-Plasmid

Nach Ligation des hSDF-1 mit dem pIRES2-GPI konnte eine Bande von ca. 400 bp für SDF-GPI und nach Ligation mit pIRES2-Fractalkine-GPI eine Bande von ca. 1100 bp für S1FG nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen Xho1 und Sall (Roche, Mannheim) in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Der restliche Teil des pIRES-Vektor zeigte sich bei dem SDF-GPI enthaltendem Plasmid bei ca. 5

kB bzw. bei dem S1FG enthaltendem Plasmid bei ca. 4,2 kB im oberen Bereich des Gels (Abb. 8).

4.3. Ligation Fusionsmolekül mit pCMVaavGFP-Plasmid

Nach PCR und Verdau mit NotI und BamH1 konnten eine 414 bp große Bande für SDF-GPI und eine 1146 bp große Bande für S1FG in der Elektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 9).

Nach Ligation des S1FG mit dem pCMV Vektor konnten mittels Gelelektrophorese nach Verdau von NotI (am Anfang SDF) und Sall (Ende Frac-GPI) die zu erwartenden Bandengrößen von SDF-GPI (ca. 400 bp) und S1FG (ca. 1100 bp) nachgewiesen werden (Abb. 10). Ein Verdau mit NotI und BamH1 (Fermentas, St. Leon) zeigte mehrere Banden, da BamH1 auch im Vektor pCMVaa2GFP Schnittstellen besitzt. Das restliche Plasmid stellte sich als ca. 5 kB große Bande im oberen Teil der Elektrophorese dar.

Eine endgültige Sequenzierung der Fusionsmoleküle erfolgte über die Firma MWG.

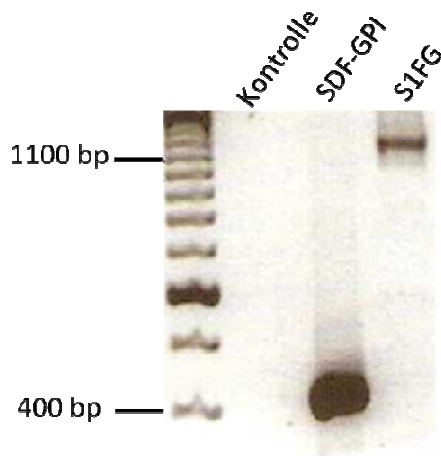


Abb. 9

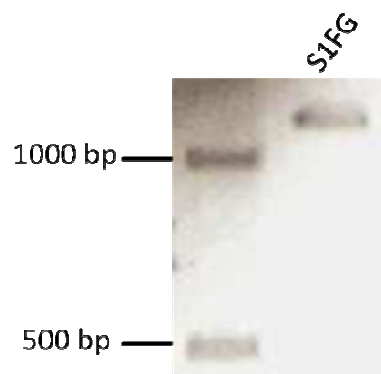


Abb. 10

Abb. 9: Gelelektrophorese der PCR-Produkte SDF-GPI (414 bp) und S1FG (1146 bp) nach Verdau mit den Restriktionsenzymen NotI und BamH1.

Abb. 10 Gelelektrophorese von pCMV-S1FG nach Ligation von S1FG mit dem pCMV-Plasmid und Restriktionsverdauung durch NotI + Sall. S1FG konnte bei 1100 bp detektiert werden.

Sequenz von S1FG (nach MWG, Ebersberg):

```
ATGAACGCCAAGTCGTGGTCTGCTGGTCCTCGTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGGA
AGCCCGTCAGCCTGAGCTACAGATGCCCATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAA
CGTCAAGCATCTCAAAATTCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAAGA
ACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCT
TTAAACAAGTCTAGAGGCGGCACCTTCGAGAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGCCCAGGACCACCC
CTGCCGCGCGGGGGAATGGACGAGTCTGTGGTCCTGGAGCCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTA
GCCTGGAGCCGACTCCTTCTTCCCAGGAAGCACAGAGGGCCCTGGGGACCTCCCCAGAGCTGC
CGACGGGTGTGACTGGTTCCTCAGGGACCAGGCTCCCCCGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAG
GGCCTGTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCCTCCCGTCTCCACTGCCGCCACGTGGCAGAGTT
CTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCAGCCTCTGGGCTGAGGCAAAGACCTCTGAGGCCCCGTCCA
CCCAGGACCCCTCCACCCAGGCCTCCACTGCGTCCTCCCCAGCCCCAGAGGAGAATGCTCCGT
CTGAAGGCCAGCGTGTGTGGGGTCAGGGGCAGAGCCCCAGGCCAGAGAACTCTCTGGAGCGG
GAGGAGATGGGTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCTTCAGGACTGGGGGCCTGGCAGCATG
GCTCACGTCTCTGTGGTCCCTGTCTCCTCAGAACG
```

4.4. Überexpression von S1FG in vitro

Nach Transfektion von 293-Zellen mit einem Kontrollvektor und pCMVaavS1FG (S1FG) konnte nach cDNA-Isolierung eine deutlich erhöhte Expression des S1FG gegenüber der Kontroll-Transfektion und SDF-1-GPI (SDF-GPI) festgestellt werden (Diagramm 1).

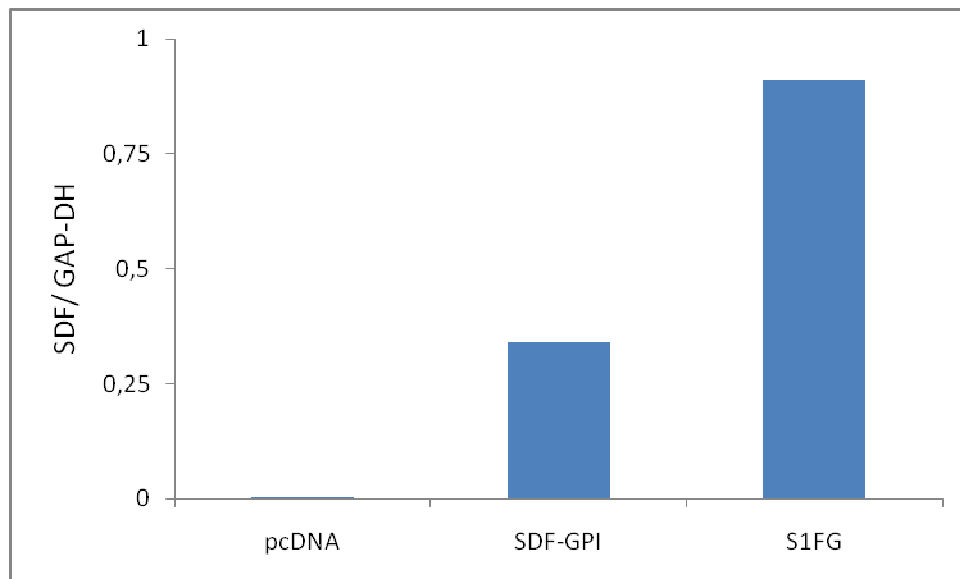


Diagramm 1: In der in vitro Überexpression nach 48h von S1FG nach pCMVaavS1FG- bzw. nach pcDNA-Transfektion in 293 Zellen konnte eine deutliche Überexpression von S1FG gegenüber der Kontrolle und dem SDF-1-GPI nachgewiesen werden.

4.5. in vitro Adhäsionsversuche mit pIRES2-IL8, -IP10, -SDF

In Vorversuchen wurden in vitro verschiedene Chemokine (IL-8, IP10 und SDF-1) auf ihre adhärierenden Eigenschaften am embryonalen Rattenendothel zu eEPCs (T17-Zellen) und humanen Monozyten (THP1-Zellen) in Flusskammern unter shearstress (μ -Slides 0,4; IBIDI) getestet. Dazu wurde das Endothel, das in Flusskammern ausgesät war, 48 h vor Versuch mit den verschiedenen Vektoren mittels Lipofectamine® (Invitrogen) transfiziert. Alle μ -Slides sind 3 h vor Versuchsbeginn mittels IL-1 β stimuliert wurden.

4.5.1. in vitro Adhäsion von eEPC und Monozyten bei IL8

In vitro zeigte sich eine deutlich erhöhte Adhäsion sowohl von Monozyten (THP1-Zellen) als auch von eEPCs (T17 Zellen) am mit IL-1 β -stimulierten Rattenendothel nach IL-8-FG-Transfektion nach shearstress. Am IL-8-FG transfizierten Endothel konnten 130 ± 12 Monozyten und 78 ± 10 eEPCs gegenüber dem mit einem Kontrollvektor (pcDNA) transfizierten Endothel (Monozyten 70 ± 5 ; eEPC 35 ± 3)

nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). Verglichen dazu zeigte sich eine verminderte Adhäsion bei dem mit IL-8-GPI transfizierten Endothel für Monozyten (90 ± 7) und eEPCs (48 ± 5 ; siehe Diagramm 2), die nicht signifikant gegen den Kontrollvektor erhöht waren. Monozyten waren dabei adhärenter als eEPCs.

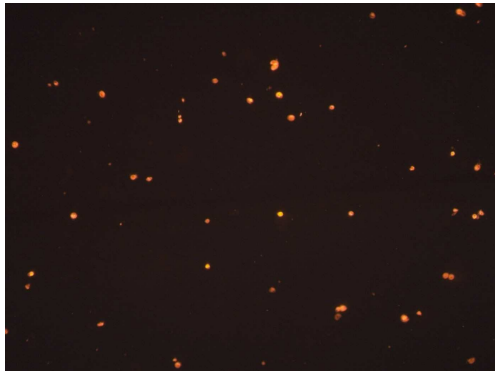


Abb. 11: pcDNA-Transfektion + eEPCs

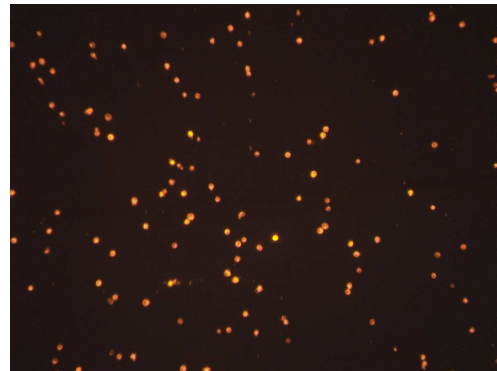


Abb. 12: IL-8-FG-Transfektion + eEPCs

Abb. 11 und 12: Die Fluoreszenzmikroskopie von adhärenenten Dil-markierten eEPCs am Rattenendothel nach pcDNA-Transfektion (Abb. 11) und IL-8-FG-Transfektion (Abb. 12) nach shearstress-Bedingungen zeigte eine signifikant höhere Anzahl von adhärenenten eEPCs (2-fach erhöht) am Endothel als in der Kontrolle.

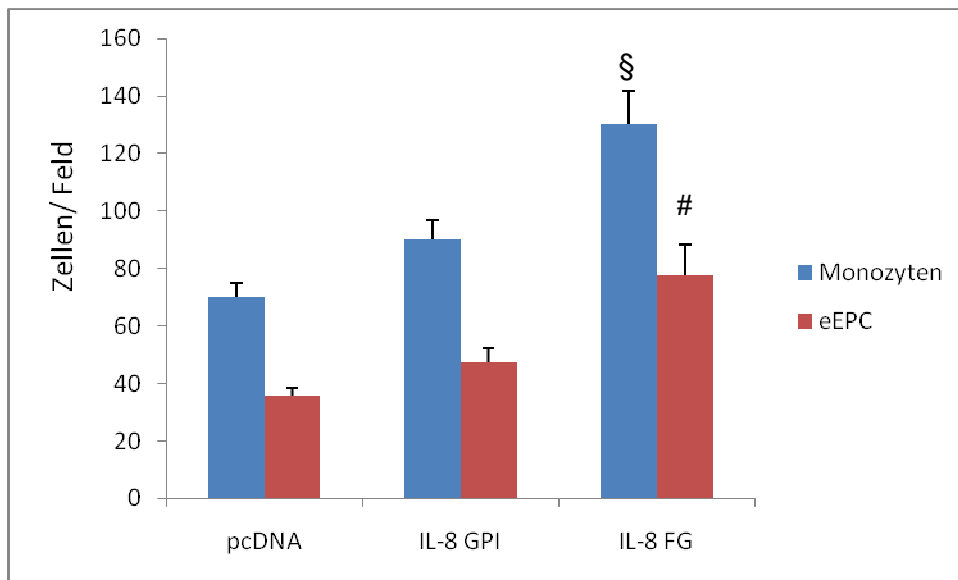


Diagramm 2: Quantitative Analyse von in vitro Adhäsionsversuchen von Monozyten und eEPCs am Rattenendothel unter shearstress Bedingungen: Eine Transfektion des Endothels mit IL-8-FG zeigte eine stärkere Adhäsion von eEPCs bzw. Monozyten gegenüber der Kontrolltransfektion (signifikant) und gegenüber der IL-8-GPI –Transfektion (nicht signifikant). Monozyten scheinen dabei adhärenter als eEPCs zu sein ($n=3$, MW \pm SEM, §/#: $p < 0.05$ gegen pcDNA).

4.5.2. *in vitro* Adhäsion von eEPC und Monozyten bei IP10

Es konnte des Weiteren eine erhöhte *in vitro* Zelladhäsion nach Shearstress von Monozyten (210 ± 10 ; Dil-markiert; Abb. 14) und eEPCs (63 ± 14 ; CellTrackerGreen-markiert; Abb. 14) bei IP10-FG-Transfektion des Endothels gegenüber der Kontrolltransfektion (Abb. 13; Monozyten 60 ± 3 ; eEPCs 20 ± 2) nachgewiesen werden. Nach Transfektion mit IP10-GPI zeigte sich eine gesteigerte Adhäsion der Monozyten (134 ± 7) und nur geringe, nicht signifikant erhöhte Adhäsion von eEPCs (34 ± 2) gegenüber der Kontrolle am Rattenendothel (Diagramm 3). Es zeigte sich auch hier, dass Monozyten adhärenter als eEPCs waren.

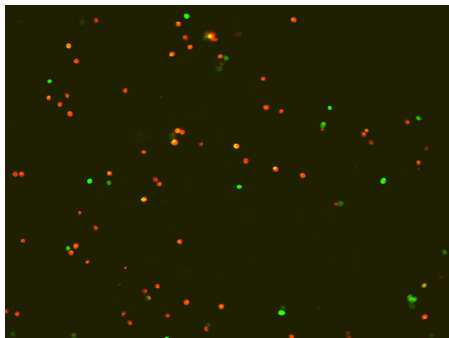


Abb. 13: pcDNA-Transfektion

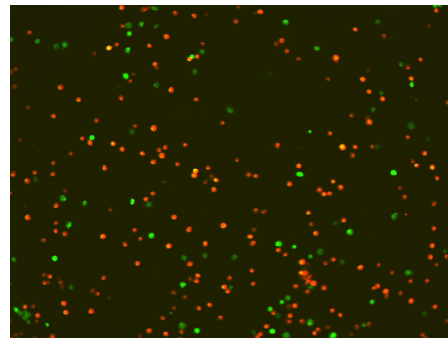


Abb. 14: IP10-FG- Transfektion

Abb. 13 und 14: Fluoreszenzmikroskopie von adhärenenten Dil-markierten Monozyten und CellTrackerGreen-markierten eEPCs am Rattenendothel nach pcDNA- Transfektion (Abb. 13) und IP10-FG-Transfektion (Abb. 14) nach shearstress-Bedingungen zeigte eine signifikant höhere Anzahl von adhärenenten eEPCs am Endothel als in der Kontrolle.

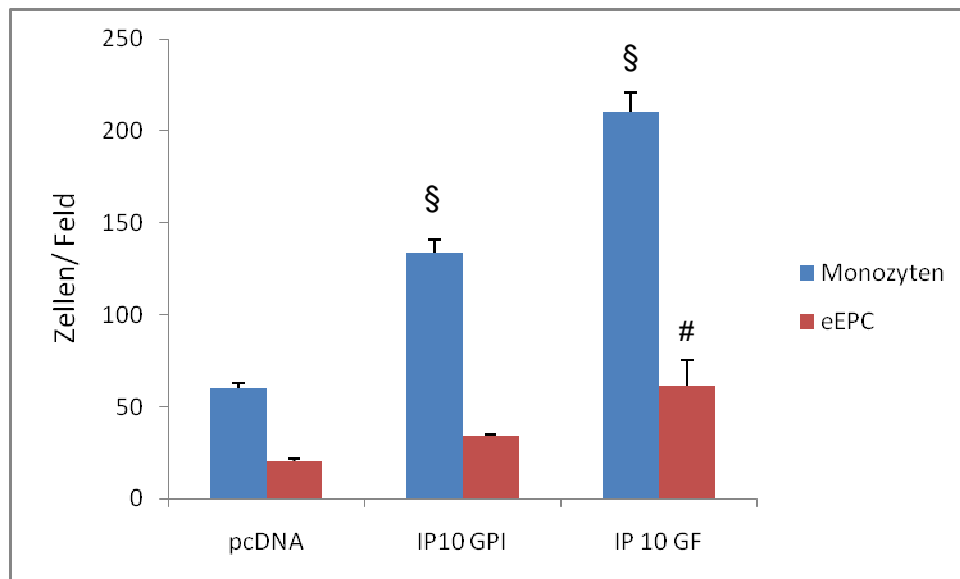


Diagramm 3: Quantitative Analyse von in vitro Adhäsionsversuchen von Monozyten und eEPCs am Rattenendothel unter shearstress-Bedingungen: Eine Transfektion des Endothels mit IP10-FG zeigte eine signifikant stärkere Adhäsion von eEPCs bzw. Monozyten gegenüber der Kontrolltransfektion und gegenüber der IP10-GPI –Transfektion bei der Monozytenadhäsion, jedoch nicht bei der eEPC-Adhäsion. Monozyten zeigten um ein vielfach erhöhtes Adhäsionsverhalten als eEPCs. (n=3, MW ± SEM, §/#: p<0.05 vs. Kontrolle).

4.5.3. *in vitro* Adhäsion von eEPC und Monozyten bei SDF1

Unter shearstress-Bedingungen im μ -slide konnte am S1FG-transfizierten Endothel (Abb. 3) eine deutlich erhöhte Adhäsion der Monozyten (Dil-markiert; 140 ± 15 ; Abb. 15) und der eEPCs (CellTrackerGreen-markiert; 85 ± 9 ; Abb. 15) gegenüber der Transfektion mit dem Kontrollvektor (Monozyten 67 ± 6 ; eEPCs 30 ± 8) nachgewiesen werden. Die Transfektion mittels SDF-GPI konnte die Anzahl der adhärenz Monozyten (91 ± 9) und eEPCs (54 ± 8) zwar erhöhen, aber nicht in der Höhe wie Transfektion mittels S1FG (Diagramm 4). Monozyten zeigten auch hier eine tendenziell bessere Adhäsion als eEPCs.

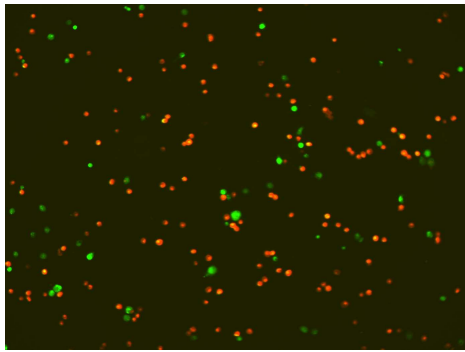


Abb. 15: S1FG-Transfektion

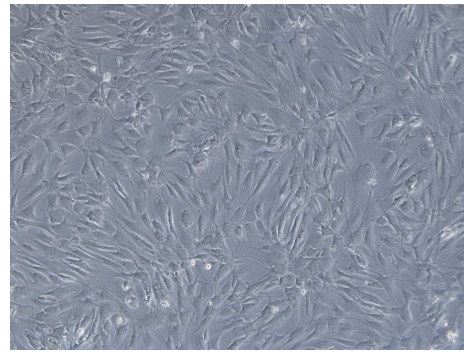


Abb. 3: Ratten-Endothel in μ -Slides

Abb. 15: Die Fluoreszenzmikroskopie von adhärenen Dil-markierten Monozyten und CellTrackerGreen-markierten eEPCs (Abb. 15) nach S1FG-Transfektion (Abb. 15) nach shearstress-Bedingungen zeigte eine signifikant höhere Anzahl von adhärenen eEPCs und Monozyten am Endothel als in der Kontrolle.

Abb. 3: Exemplarisch dargestelltes Endothel, das sich in μ -slides befindet und für die Adhäsionsversuche unter shearstress-Bedingungen verwendet wurde.

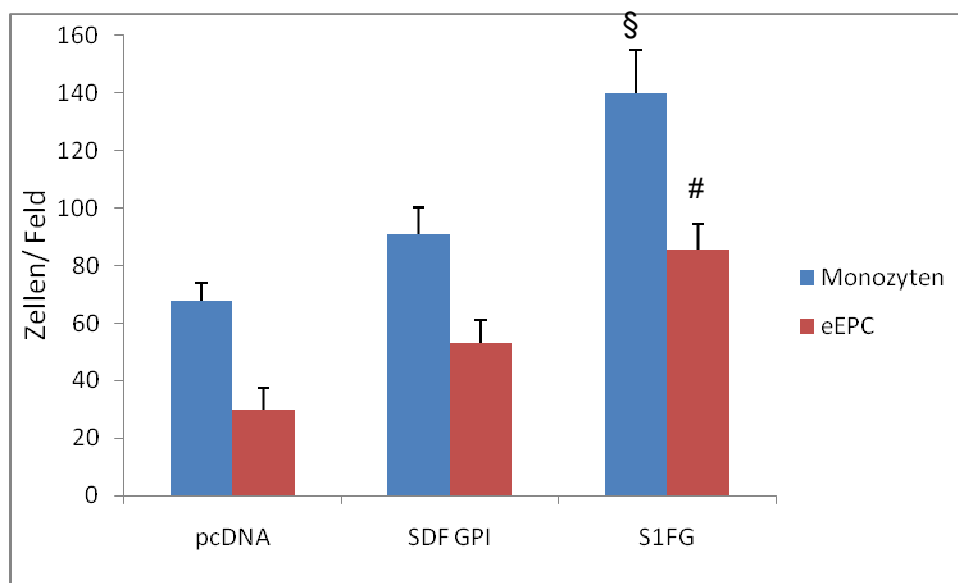


Diagramm 4: Quantitative Analyse von in vitro Adhäsionsversuchen von Monozyten und eEPCs am Rattenendothel unter shearstress-Bedingungen: Eine Transfektion des Endothels mit S1FG zeigte eine stärkere Adhäsion von eEPCs bzw. Monozyten gegenüber der Kontrolltransfektion (signifikant) und gegenüber der SDF-GPI –Transfektion (nicht signifikant). Monozyten waren tendenziell adhärenter als eEPCs ($n=3$, $MW \pm SEM$, §/#: $p < 0.05$ vs. Kontrolle).

In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit SDF-1- α eine erhöhte eEPC-Adhäsion (49 ± 6) bewirkt. Die bereits gezeigte erhöhte Zelladhäsion nach S1FG-Transfektion konnte bestätigt werden (eEPCs 94 ± 10 ; Abb. 17) und war

signifikant höher als nach der Transfektion mit dem Kontrollvektor pcDNA (24 ± 4 ; $p < 0,01$; Abb. 16). Das S1FG bewirkte sogar eine signifikant höhere Zelladhäsion von eEPCs gegenüber SDF-GPI (57 ± 8).

Nach Transfektion mit einem nur Fractalkine enthaltenden Vektor konnte ebenfalls eine erhöhte Adhäsion der eEPCs (68 ± 7) am Endothel festgestellt werden (Diagramm 5).

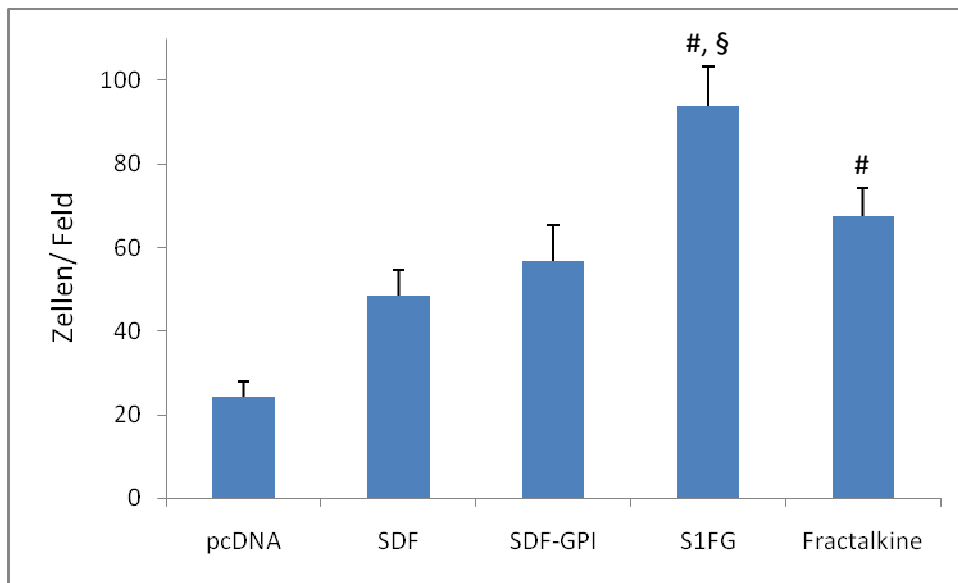


Diagramm 5: Quantitative Analyse von in vitro Adhäsionsversuchen von eEPCs am Rattenendothel: Eine Transfektion des Endothels mit S1FG zeigte eine signifikant stärkere Adhäsion von eEPCs gegenüber der Kontrolltransfektion und gegenüber der SDF-GPI –Transfektion sowie der Fractalkine-Transfektion (MW ± SEM; #: $p < 0,01$ vs. pcDNA, §: $p < 0,05$ vs. SDF-GPI).

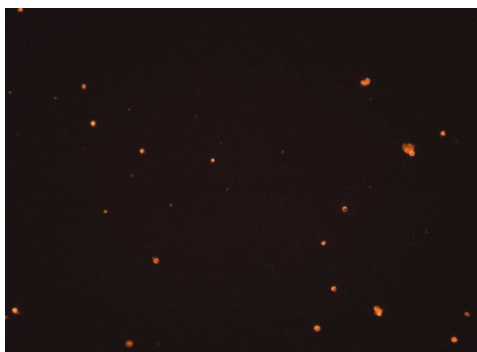


Abb. 16: pcDNA + eEPC (Dil-labeled)

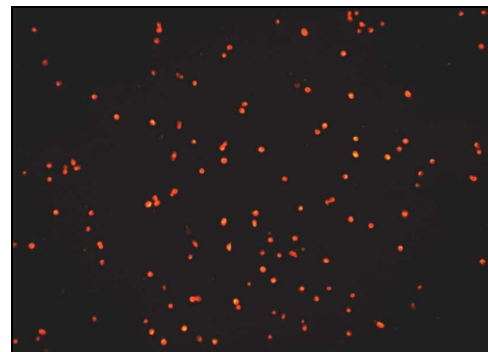


Abb. 17: S1FG + eEPC (Dil-labeled)

Abb. 16 und Abb.17: Die Fluoreszenzmikroskopie von adhärenenten Dil-markierte eEPCs am Rattenendothel nach pcDNA- Transfektion (Abb. 16) und S1FG-Transfektion (Abb.17) zeigte eine signifikant höhere Anzahl von adhärenenten eEPCs am Endothel als in der Kontrolle.

4.6. *in vivo* Adhäsion: erhöhte Detektion von Dil-markierten eEPCs nach S1FG-Transfektion im ischämischen Muskel

48 h nach Retroinfusion (Tag 11) von 5 Millionen Dil-markierten eEPCs (Tag 9) konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von Dil-markierten eEPCs in allen Muskeln des ischämischen rechten Hinterlaufs nach S1FG-Behandlung detektiert werden. Im Beispiel des M. fibularis des S1FG vorbehandelten Hinterlaufs konnte eine ca. 5-fach höhere Zahl Dil-markierter eEPCs (50 ± 15 ; Abb. 19a und Abb. 19b) gegenüber des nur eEPC-behandelten Hinterlaufs (9 ± 2 ; Abb. 18a und Abb. 18a) gefunden werden (Diagramm 6; $n=3$).

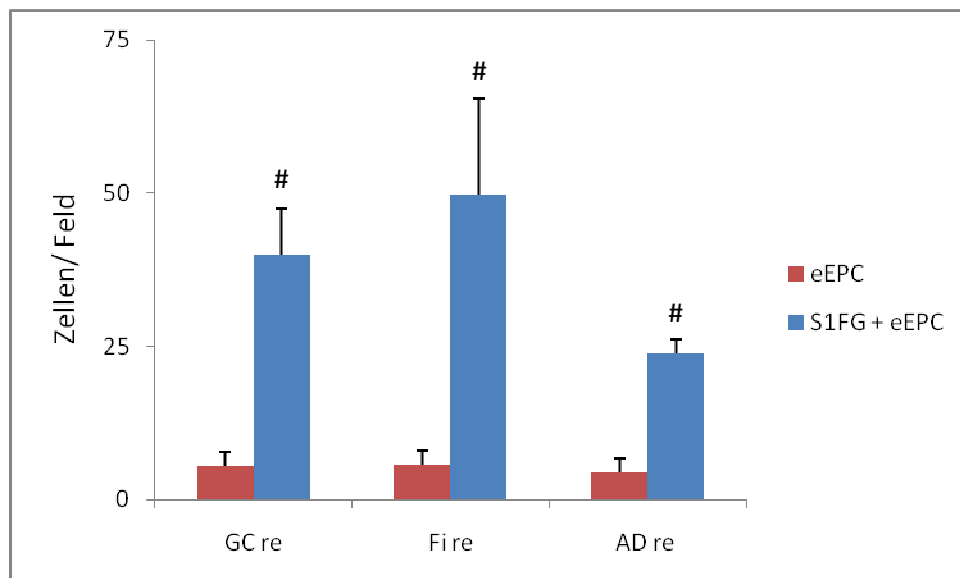


Diagramm 6: Quantitative Analyse der *in vivo* Adhäsion von eEPC-Adhäsion: In den exemplarisch dargestellten Muskeln (Gastrocnemius GC, Fibularis Fi, Adduktor AD) konnte eine signifikant höhere Anzahl von eEPCs im rechten ischämischen Hinterlauf nach S1FG- Behandlung als ohne S1FG-Gabe detektiert werden (alle Daten $MW \pm SEM$; #: $p < 0,05$; S1FG + eEPC vs. eEPC).

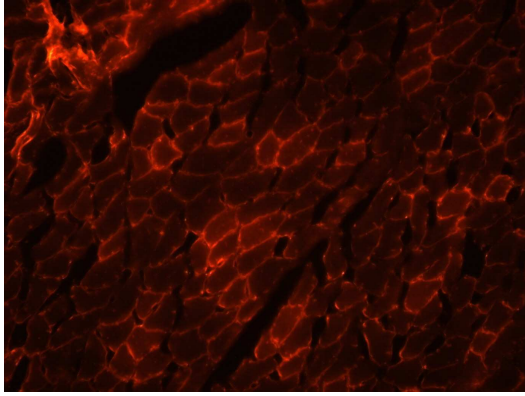


Abb. 18a: mock + eEPCs

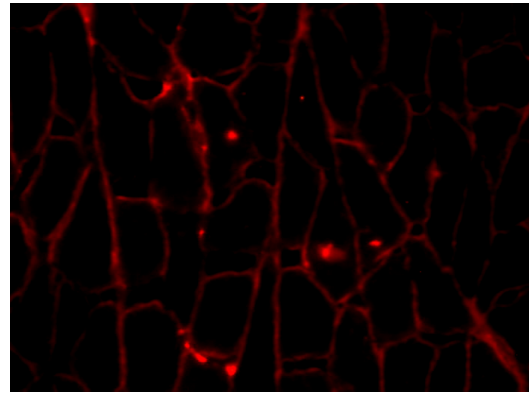


Abb. 18b: Mock + eEPCs

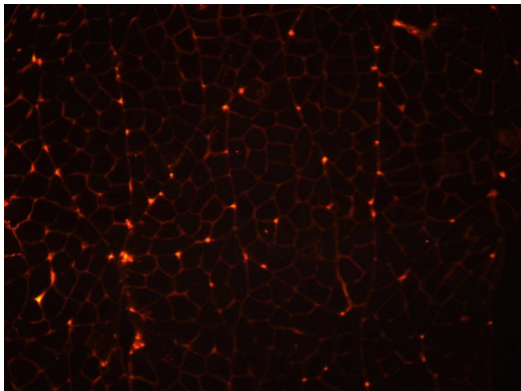


Abb. 19a: S1FG + eEPCs

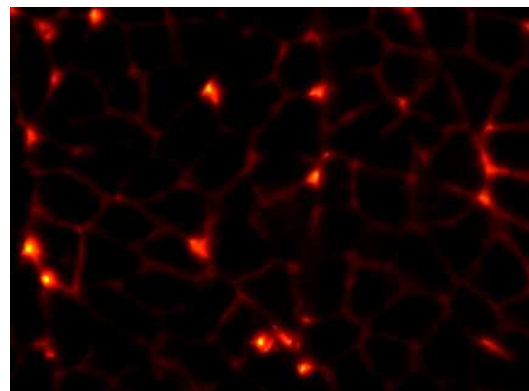


Abb. 19b: S1FG + eEPCs

Abb. 18 und 19: Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von Dil-markierten eEPCs (rot) im ischämischen Hinterlauf. Abb.18a und 19a: M.fiularis rechts bei 10-facher Vergrößerung; Abb. 18b und 19b: M.fiularis rechts bei 40-facher Vergrößerung. Es konnten nach S1FG-Behandlung (Abb. 19a und 19b) deutlich mehr Dil-markierte eEPCs im ischämischen Muskel als in den nur eEPC-behandelten Geweben nachgewiesen werden.

In allen Muskel des Hinterlaufs (exemplarisch dargestellt M. gastrocnemius (GC), M. fibularis (Fi) und M. adductus (AD)) konnten Dil-markierte eEPCs nachgewiesen werden. Es wurden dabei deutlich mehr Zellen im rechten ischämischen Hinterlauf (z.B. GC: 40 ± 8) als im linken nicht ischämischen Hinterlauf (z.B. 12 ± 4) detektiert werden (Diagramm 7).

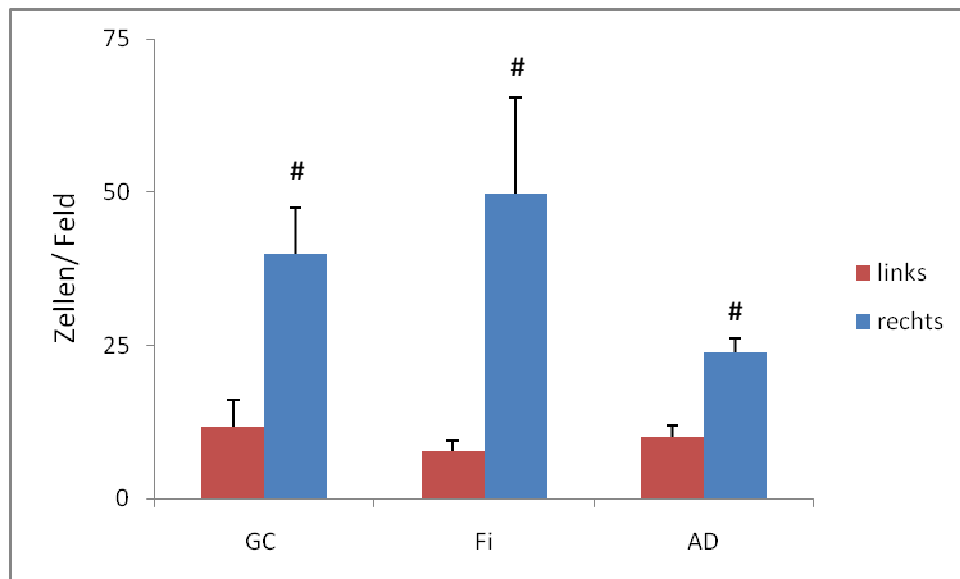


Diagramm 7: Quantitative Analyse von Dil-markierten eEPCs im Hinterlauf an Tag 11. Quantitative Analyse der in vivo Adhäsion von eEPC-Adhäsion: In den exemplarisch dargestellten Muskeln (Gastrocnemius GC, Fibularis Fi, Adduktor AD) konnte eine signifikant höhere Anzahl von eEPCs nach S1Fg-Behandlung im rechten ischämischen Hinterlauf als im linken nicht ischämischen Gewebe detektiert werden.

4.7. Langzeitversuche – Verbesserung des proangiogenen Potentials von eEPCs durch S1FG-Vorbehandlung

4.7.1. Kapillarwachstum

Nach 35 Tagen zeigte sich in den histologischen Analysen eine ähnliche Kapillardichte (Kapillar-Muskelfaser-Verhältnis, K/MF) im ischämischen Hinterlauf verglichen zum nicht ischämischen kontralateralen Hinterlauf in der Kontrollgruppe (Abb. 20; MW Unterschenkelmuskel rechts $1,46 \pm 0,3$ versus links $1,26 \pm 0,2$). Nach eEPC-Behandlung via Retroinfusion konnte eine signifikante Zunahme der Kapillardichte im ischämischen Gewebe verzeichnet werden ($1,77 \pm 0,1$; Abb. 21). In der Gruppe, die S1FG 48 h vor eEPC-Retroinfusion erhalten hatte, zeigte sich ebenfalls eine deutliche Zunahme des K/MF-Verhältnisses ($1,76 \pm 0,15$; Abb. 22 und 23) verglichen zur Kontrollgruppe. Es gab im Vergleich zur eEPC-Gruppe in der S1FG-Gruppe keine Änderung der Kapillardichte, die einer gesteigerten Mikroangiogenese entsprechen würde (Diagramm 8). In dieser Gruppe konnte eine vermehrte Dichte der Kapillaren im ischämischen Hinterlauf gegenüber dem nicht-ischämischen Hinterlauf nachgewiesen werden ($1,76 \pm 0,15$ versus $1,31 \pm 0,1$).

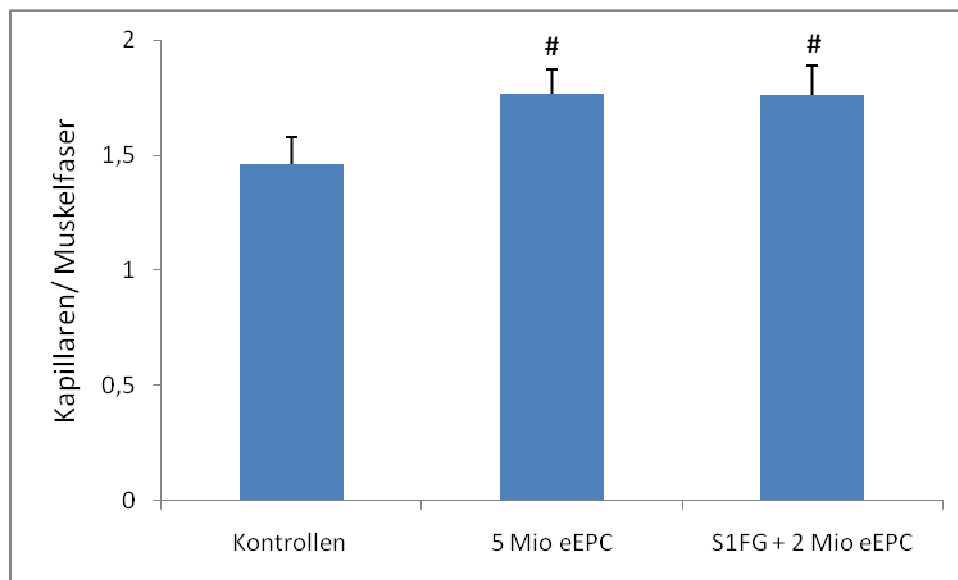


Diagramm 8: Quantitative Analyse des K/MF-Verhältnis: Sowohl in der eEPC-Gruppe als auch in der S1FG-eEPC-Gruppe war verglichen zur Kontrolle (NaCl) ein vermehrtes Kapillarwachstum nachweisbar, jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (alle

Daten Unterschenkel Muskel MW \pm SEM; # $p < 0,05$ vs. Kontrolle; eEPc vs. S1FG + eEPc nicht signifikant).

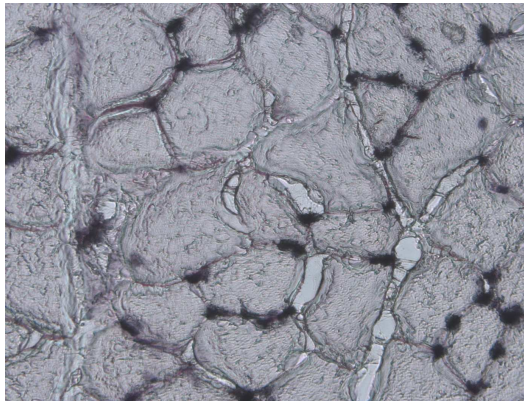


Abb. 20: Kontrolle

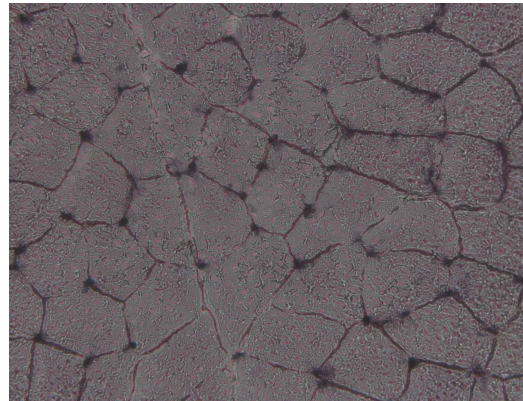


Abb. 21: eEPC

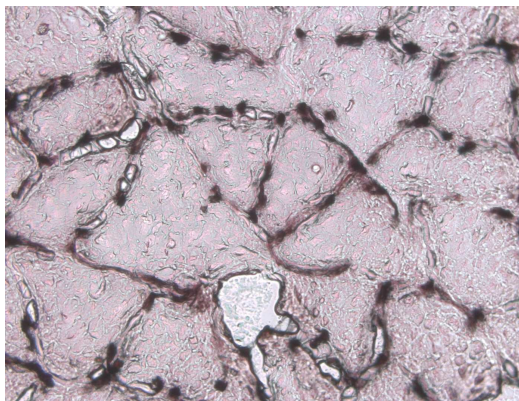


Abb. 22: S1FG + eEPC

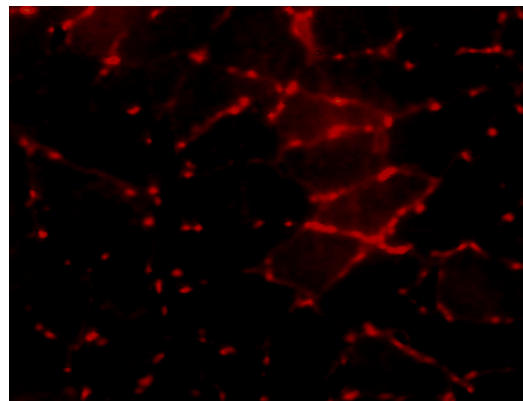


Abb. 23: PECAM-1 S1-FG +eEPC

Abb. 20 bis 22: Qualitative Analyse des Kapillarwachstum: In der AP-Färbung konnte eine Zunahme der Kapillardichte (exemplarisch im M. fibularis bei 32-facher Vergrößerung) in der eEPC-behandelten und in der S1FG-eEPC-behandelten Gruppe verglichen zur Kontrolle (NaCl) festgestellt werden. Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopie von CD31-positiven Zellen (PECAM-1): Exemplarisch im M. fibularis rechts (40-fache Vergrößerung) konnten vermehrt CD-31-positive Endothelzellen für die verbesserte Kapillarisierung nach S1FG-eEPC-Behandlung nachgewiesen werden.

4.7.2. Kollateralbildung

In den Langzeitversuchen konnten keine signifikante Änderung in der Kontrollgruppe in der Kollateralisierung am Tag 35 (129 ± 19) zu Tag 7 (118 ± 18 ; Abb. 24)

nachgewiesen werden (Tag 35/ Tag 7: $104\% \pm 4\%$). Dagegen zeigte sich in der Gruppe, die am Tag 9 mittels Retroinfusion eEPCs erhalten hatten, eine Zunahme der Kollateralen von 130 ± 16 auf 179 ± 13 (Abb. 25), welches eine signifikante Steigerung der Kollateralausbildung zeigte ($140\% \pm 8\%$). Die mit S1FG am Tag 7 vorbehandelten Kaninchen zeigten ebenfalls eine Steigerung der Kollateralisierung von Tag 7 79 ± 3 auf 159 ± 10 (Abb. 26) am Tag 35 ($201\% \pm 11\%$). Die Ausbildung vermehrter Kollateralen in der S1FG + eEPC- Gruppe war signifikant erhöht gegen der eEPCs-Gruppe. Die eEPC-Gruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine deutliche Steigerung im Kollateralwachstum (Diagramm 9). Dies spricht für einen makroarteriogenen Effekt der S1FG-eEPC-Kombinationsbehandlung.

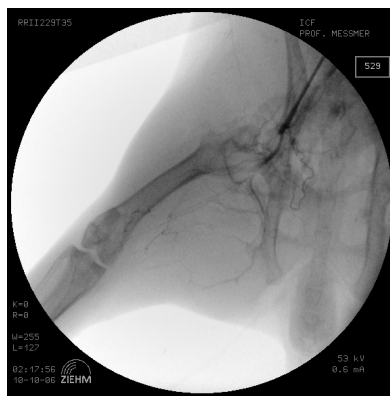


Abb. 24 Kontrolle



Abb. 25: eEPC



Abb. 26: S1FG + eEPCs

Abb. 24 bis 26: Angiographische Darstellung der Kollateralisierung: Es konnte eine verbesserte Kollateralbildung nach eEPC-Behandlung (Abb. 25) verglichen zur Kontrolle (NaCl; Abb. 24) nachgewiesen werden. Nach S1FG-eEPC-Behandlung (Abb. 26) konnte eine weitere Steigerung des Kollateralwachstums angiographisch dargestellt werden.

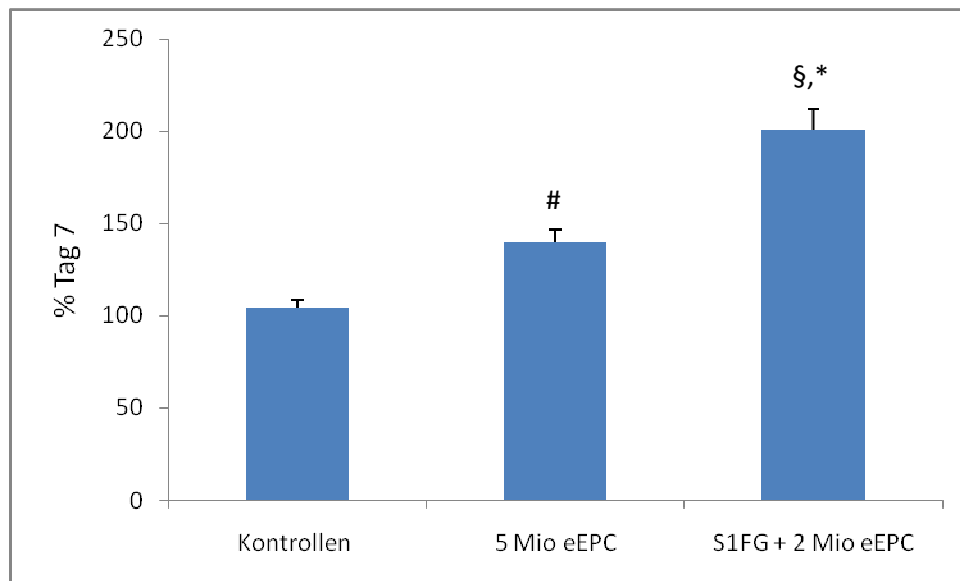


Diagramm 9: Quantitative Analyse des Kollateralwachstums: eEPC-Behandlung konnte eine signifikante Wachstumszunahme von Kollateralen gegenüber der Kontrolle (NaCl) induzieren. S1FG-eEPC-Behandlung konnte sogar eine weitere signifikante Steigerung gegenüber der eEPC-Gruppe erzeugen (Anzahl der Kollateralen T35 zu Anzahl der Kollateralen Tag 7 in %; alle Daten MW ± SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; §: $p < 0,01$ vs. Kontrolle; *: $p < 0,05$ vs. eEPC).

4.7.3. Perfusion (Cinedensometrie und Mikrosphären-Messung)

Nachdem es keinen signifikanten Unterschied in der Kapillardichte zwischen der eEPC-Gruppe und der S1FG-Gruppe, jedoch ein vermehrtes Kollateralwachstum in der S1FG-Gruppe gab, wurde die Perfusion der ischämischen Muskel analysiert. In der Cinedensometrie konnte in beiden behandelten Gruppe eine deutliche Zunahme des Flusses gegenüber Tag 7 nachgewiesen werden (eEPC: $169\% \pm 3\%$, $p < 0,05$; S1FG+eEPC: $217\% \pm 6\%$, $p < 0,01$ versus Kontrollen $102\% \pm 9\%$; Diagramm 10). Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden behandelten Gruppen zeigte sich interessanterweise jedoch nicht. Tendentiell war aber eine bessere Perfusion bei den S1FG-behandelten Tieren feststellbar.

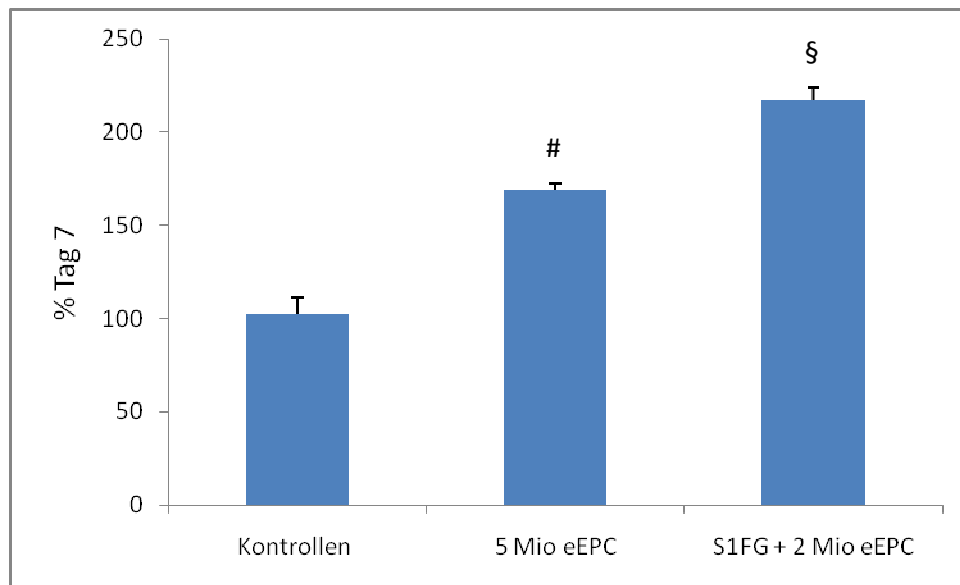


Diagramm 10: Quantitative Analyse der Perfusion mittels Cinedensometrie: Nach S1FG-eEPC- und eEPCs-Behandlung konnte eine verbesserte Perfusion nachgewiesen werden (frame count T35 zu frame count T7 in %; alle Daten MW ± SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; §: $p < 0,01$ vs. Kontrolle).

In den Mikrosphärenmessungen zur Bestimmung des regionalen Blutflusses konnte ebenfalls in beiden Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe ($105\% \pm 5\%$) eine signifikante Steigerung nachgewiesen werden (Diagramm 11). In der S1FG-eEPC Gruppe zeigte sich eine Steigerung zum Tag 7 von $201\% \pm 12\%$, die der eEPC-behandelten Gruppe entsprach ($155\% \pm 12\%$). Hiermit bestätigte sich das Ergebnis der Cinedensometrie.

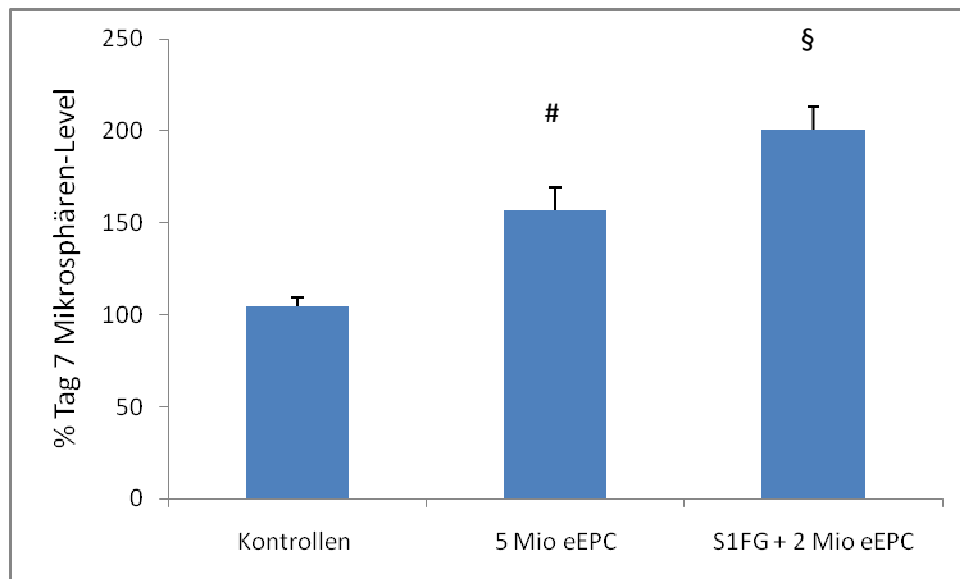


Diagramm 11: Quantifizierung des regionalen Blutflusses mittels Mikrosphärenlevels: In den Mikrosphärenbestimmungen konnte bei den eEPC- als auch bei den S1FG-eEPC-behandelten Tieren ein signifikant verbesserter Blutfluss im ischämischen Hinterlauf nachgewiesen werden, dabei wies die S1FG vorbehandelte Gruppe tendenziell einen besseren Blutfluss auf (Fluoreszenz ischämisch zu nichtischämisch zwischen Tag 35 und Tag 7 in %; alle Daten $MW \pm SEM$; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $p < 0,05$ vs. 5 Mio eEPC).

4.8. SDF-1-Expressions-Nachweis im Gewebe

In der SDF-1 – PECAM-1 – Doppelfärbung konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie in 42-facher Vergrößerung CD31-positive Endothelzellen (rot) und SDF-1 positive Zellen (grün) nachgewiesen werden (Abb. 27). Dabei waren SDF-1 exprimierende Zellen in unmittelbarer Umgebung zu CD31 positiven Zellen im Muskel 4 Tage nach S1FG-Applikation zu detektieren. Diese SDF-1-exprimierenden Zellen konnten dabei nicht in der Schicht der direkt lumenbildenden Endothelzellen des Gefäßes nachgewiesen werden. Dagegen konnten in den Kontrollen nur CD31 positive Zellen festgestellt werden, es waren keine SDF-1-positiven Zellen nachweisbar (Abb. 28).

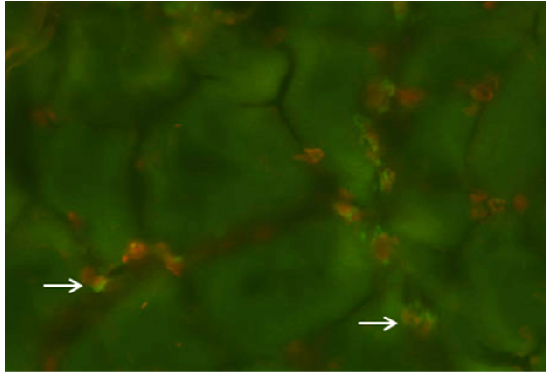


Abb. 27: S1FG



Abb. 28: Kontrolle

Abb. 27 und 28: Fluoreszenzmikroskopie des M. gastrocnemius rechts in 40-facher Vergrößerung am Tag 4 nach S1FG-Gabe: SDF-1-positive Zellen (grün, Pfeil) befinden sich direkt neben CD31-positiven Zellen im S1-FG behandelten Tier (Abb. 27). Im Kontrollgewebe (Abb. 28) konnte bei CD31-positiven Zellen (rot) kein SDF nachgewiesen werden.

Regeneration von Geweben inklusive autologer Stimulation der Angiogenese ist ein vielversprechender experimenteller Ansatz in der Behandlung chronischer, aber auch akuter Ischämie bei pAVK oder Herzinfarkten sowie bei Schlaganfällen. Aufgrund des angiogenen Potentials von EPCs sind diese Zellen für die Behandlung von chronischen und akuten Ischämien im Rahmen der Stammzelltherapie besonders interessant für neuere Therapieoptionen. Ebenso ist aber auch der Einsatz von Chemokinen bzw. Wachstumsfaktoren in der Gentherapie nicht zu unterschätzen.

In klinischen Phase I und II Studien konnten bereits VEGF (RAVE), FGF (TALISMAN, TAMARIS, TRAFFIC), HGF sowie HIF1a (WALK) bei Patienten mit pAVK (insbes. bei der kritischen Ischämie) getestet werden, jedoch bildeten sich hier unterschiedliche Ergebnisse heraus [Kopp et al. 2004; Nikol 2007, Gresele et al. 2011]. Einerseits konnte die Perfusion mittels verstärkter Kollateral- und auch Kapillarbildung und damit die Lebensqualität der Patienten durch weniger Amputationen, Schmerzreduktion und Mobilitätssteigerung verbessert werden, andererseits gibt es bisher noch keine größeren Vergleichsstudien zur Effektivität bei der Behandlung der Patienten.

Für die therapeutische Neovaskularisation sind auch Stammzellen bereits in Phase-II-Studien untersucht wurden. Patienten erhielten dabei mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark bzw. aus dem peripheren Blut. Autolog konnten Progenitorzellen durch G-CSF-Triggerung mobilisiert werden. Verbesserungen bei Schmerzen, Gehstrecke und Wundheilung zeigten den positiven Effekt dieser Zellen z.B. in der TACT-Studie auf [Kopp et al. 2004; Nikol 2007, Gresele et al. 2011].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Adhäsionsprotein so konstruiert, dass es neben einem chemoattraktiven Kopf (SDF-1) ein stabilisierendes Rückgrat (Fractalkine) und einen GPI-Anker enthält (S1FG). Im Folgenden wird nun die Bedeutung dieses Moleküls in der Angiogenese, insbesondere des modifizierten Homings von EPCs und damit deren Auswirkung auf das angiogene Potential von EPCs näher erläutert.

5.1. Beeinflussung der Adhäsion und des Homing von eEPCs

EPCs haben dabei ein hohes angiogenes Potential. Diese Zellen können in vitro Röhren-ähnliche Strukturen bilden bzw. sich an bereits vorhandenen Endothelzellen-Reihen anlagern [Rae et al. 2011]. Wie bereits berichtet konnten Kawamoto, Asahara und Isner bereits 1999 das selektive Einwandern in Ischämiegebiete und die gesteigerte EPC-induzierte Neovaskularisation nachweisen. Kupatt et al. berichtete 2005 über eine abfallenden Anzahl nachweisbarer eEPCs in ischämischen Gebieten nach deren Applikation im xenogenen Modell der chronischen Ischämie. Trotz Abstoßungsreaktion waren die xenogen transplantierten Zellen weiterhin in der Lage, eine bessere Gewebesperfusion durch vermehrte Kapillarisation und Kollateralisierung in adulten Geweben zu induzieren.

5.1.1. In vitro Beeinflussung der Adhäsion

In den durchgeführten in vitro Versuchen konnte anhand des mit verschiedenen Chemokinen transfizierten Endothels (IL-8, IP-10, SDF-1; mit oder ohne GPI bzw. GPI-Fractalkine-Gerüst) eine gesteigerte Adhäsion von einer monozytären Zelllinie (THP1-Zellen) und eEPCs festgestellt werden. Dabei waren Monozyten an dem mit den Chemokinen IL-8 und IP-10 transfizierten Endothel besonders adhären, da diese Chemokine besonders auf Leukozyten adhären wirken.

Die mit dem Fractalkine-GPI-Gerüst versehenen Moleküle konnten dabei eine bessere Adhäsionsrate erreichen als die nur mit dem GPI-Anker versehenen Moleküle. Dies wird dadurch erreicht, dass das Fractalkine-GPI-Gerüst aufgrund der Eigenschaft Chemoattraktivität und der festen Adhäsion mehr Zellen adhären lässt als ein Molekül mit GPI-Anker und dem alleinigen Stimulus des an der Spitze präsentierten Chemokins.

Bei den Versuchen mit transfiziertem SDF-1 bzw. modifiziertem SDF-1 konnte zusätzlich eine deutlich bessere Adhäsion von eEPCs nachgewiesen werden als bei den Versuchen mit IL-8 oder IP-10. Diese adhären Wirkung wird über die affine SDF-1-CXCR4-Interaktion bzw. Bindung vermittelt, dabei werden die CXCR4-exprimierenden eEPCs gezielt von dem SDF-1 oder dem SDF-1-GPI bzw. S1FG

transfiziertem Endothel (siehe Diagramm 4 und 5) angelockt und über die spezifische Bindung von SDF-1 und CXCR4 fester adhäriert. Weiterhin wird durch die erhöhte chemoattraktive und stabiladhärierende Wirkung des Fractalkine-Gerüsts der Effekt noch verstärkt.

Die durch Fractalkine im S1-FG, IL-8Fractalkine-GPI oder IP10-Fractalkine-GPI stärker hervorgerufene Adhäsion ist auf die starke Adhäsionswirkung und daraus folgender Leukozytenaktivierung und –bindung zurückzuführen.

5.1.2. Bedeutung von S1FG für das Homing von eEPCs in vivo

EPC besitzen ein hohes angiogenes Potential, das durch Zugabe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Chemokinen verstärkt werden kann [Walenta et al. 2010; Chade et al. 2010; Huang et al. 2010; Rae et al. 2011]. Sowohl SDF-1 als auch Fractalkine können Angiogenese induzieren. Die Kombination dieser 2 Chemokine in einem Konstrukt mit eEPC ermöglicht hier nun eine deutliche Potenzierung von Zellrekrutierung durch verstärkte Chemotaxis via SDF-1 und verbesserte Zelladhäsion via Fractalkine-bedingter „firm adhesion“.

Nachdem in vitro das mit S1G-transfizierter Endothel die höchste eEPC-Adhäsionszahl gezeigt hatte, wurde in vivo dieses Molekül gezielt in ischämischer Muskulatur zur Modifizierung der eEPC-Rekrutierung eingesetzt. Die gesteigerte Detektion (Abb. 18 bis 21, Diagramm 6 und 7) von eEPCs im S1FG behandelten ischämischen Hinterlauf gegenüber des nicht mit S1FG behandelten ischämischen Hinterlauf kann auch hier über die spezifische Interaktion von SDF-1 mit CXCR4 erklärt werden. Die deutlich erhöhte Anzahl detektierter eEPCs wird durch die stabilisierte Adhäsion durch das Fractalkine-GPI-Gerüst erzielt. Die Chemokine SDF-1 und Fractalkine allein können jeweils selbst eine vermehrte Migration und daraus folgende Adhäsion von CD34/CD133/VEGFR2-positiven Zellen vermitteln, wobei SDF-1 das stärker migrationsfördernde und Fractalkine das stärker adhärente Molekül am Endothel ist [Walenta et al. 2011].

Es sollte ebenso bedacht werden, dass nicht alle applizierten eEPCs trotz lokaler Injektion hauptsächlich in den ischämischen Hinterläufen nachzuweisen sind. Eine Vielzahl eEPCs konnten auch in Milz und Leber wiedergefunden werden (nicht in

den Ergebnissen dargestellt). Durch die Methode der Retroinfusion in die V. tibialis ant. können nicht alle Zellen in das Kapillarbett appliziert werden, sodass ein Teil der Zellen trotz Kompression der V. femoralis über kleinere Venen des Hinterlaufs abgeschwemmt und in Milz, Leber oder anderen Organen wiedergefunden werden. Dies konnte ebenfalls in vorherigen Analysen mittels radioaktiv markierten CD34-positiven Zellen unabhängig von der Applikationsart (i.v., i.a. oder i.m.) gezeigt werden [Chavakis, Urbich, Dimmeler. 2008; Huang et al. 2010]. Jedoch war trotz unterschiedlicher Zellapplikationsart ein selektives Einwandern in ischämische Gewebe beobachtbar, die durch Induktion von Neovaskularisierung eine verbesserte Perfusion hervorriefen.

In vivo muss weiterhin davon ausgegangen werden, dass in ischämischen Geweben zu dem exogen applizierten S1FG auch endogenes SDF-1 ausgeschüttet wird, das wiederum endogene Zellen hämatogener Abstammung mit angiogenem Potential anlockt. Auch Fractalkine kann z.B. Monozyten und T-Lymphozyten vermehrt in das ischämische Gebiet rekrutieren und aktivieren, was eine weitere Rekrutierung endogener Knochenmark abstammenden Zellen induziert [Kasama et al. 2010]. Über parakrine Stimulation und weiterer Ausschüttung proangiogener Faktoren wie VEGF, PDGF etc. durch die adhätierenden und zum Teil bereits inkorporierten EPCs und perivaskulären Zellen wird ein zusätzlicher proangiogener Stimulus auf das Homing von eEPCs und auch auf körpereigene Knochenmarkszellen ausgeübt. Diese Zellen und deren Effekt sowie endogenes SDF-1 wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Das Homing von proangiogenen Zellen wird aber nicht nur über die SDF-1-CXCR4-Achse beeinflusst, sondern zusätzlich über die Wirkung des membrangebundenen Fractalkines als Adhäsionsmolekül. Es gibt verschieden Ansätze, die Rekrutierung zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurde nur ein möglicher Weg über das verbesserte Homing von eEPCs in ischämischen Geweben durch ein modifiziertes, lokal appliziertes Adhäsionsmolekül aufgezeigt.

5.2. Auswirkung der modifizierten Rekrutierung von eEPCs durch S1FG

Durch die verbesserte Rekrutierung der eEPCs mittels S1FG-Transfektion im ischämischen Hinterlauf wurden weiterhin in dieser Arbeit Funktionsanalysen mit der Frage des Effekts des gesteigerten Einwanderns auf die eEPC vermittelte Neovaskularisation durchgeführt.

5.2.1. Beeinflussung der Kollateralbildung

Im Blick auf die Kollateralbildung konnte in den durchgeführten Untersuchungen eine Verbesserung der Kollateralisierung durch eine Ko-Behandlung von S1FG mit eEPCs gegenüber einer alleinigen Behandlung mit eEPCs erreicht werden (Abb. 24 bis 26, Diagramm 9). Dies spricht für einen Effekt der verstärkten Rekrutierung von eEPCs durch S1FG. Die Zunahme der Kollateralen spiegelt den Anteil der stattfindenden Arteriogenese der therapeutischen Neovaskularisation wieder. Die durch S1FG stimulierten EPCs wirken somit indirekt auf die Endothelzellen der Gefäßwand, indem sie z.B. durch Verstärkung der Scherkräfte oder durch einen parakrinen Stimulus die vorhandenen Endothelzellen zur Proliferation und Gefäßdilatation anregen und damit Arteriogenese induzieren.

Die Anzahl der Kollateralen an Tag 7 in der S1FG + eEPC behandelten Gruppe scheint mit durchschnittlich 80 Kollateralen gegenüber der Kontrollgruppe (118) und der eEPC-Gruppe (130), jedoch stellt sich in den einzelnen Gruppen die Anzahl der Kollateralen unter den einzelnen Versuchstieren gleich dar ohne eine andere Behandlung erhalten zu haben. Die körpereigene (endogen induzierte) Neovaskularisation bis zum Tag 7 der einzelnen Tiere ist hier als Limitation zu beachten.

5.2.2. Beeinflussung der Kapillarbildung

Die Kapillardichte, die durch EPC-Behandlung erhöht werden konnte [Kawamoto et al. 2001; Kupatt et al. 2005], kann durch die S1FG-vermittelte eEPC-Rekrutierung

verglichen zu der alleinigen eEPC-Behandlung tendenziell, jedoch nicht signifikant gesteigert werden (Diagramm 8 und Abb. 20 bis 23). Es stellt sich hier die Frage, ob die parakrine Sekretion von proangiogenen Faktoren hier im Zeitverlauf nicht ausreichend genug ist, um eine vermehrte Ausbildung von neuen Gefäßknospen aus Endothelzellen zu induzieren (trotzdem die Anzahl der initial rekrutierten eEPCs mittels S1FG deutlich gesteigert werden konnte). Durch die Vorstimulation mittels S1FG in ischämischen Geweben konnte die durch eEPC-vermittelte Angiogenese nicht effizient gesteigert werden. Dies lässt vermuten, dass die höhere Zahl rekrutierter eEPCs keinen gesteigerten Einfluss auf die Kapillarbildung hat, sodass man wiederum vermuten muss, dass es eine obere Grenze in der Kapillardichte von (ischämischen) Geweben und Inkorporation von zirkulierenden EPCs gibt.

5.2.3. Einfluss auf die regionale Perfusion

Betrachtet man nun die Auswirkung von S1FG auf die eEPC-induzierte Kapillarisierung und Kollateralisierung zusammenfassend, konnte in den Perfusionsanalysen ein deutlicher Benefit der S1FG-Vorbehandlung gegenüber der alleinigen eEPC-Gabe in der Cindensometrie nachgewiesen werden. In den Messungen des Blutflusses mittels fluoreszierenden Mikrosphären konnten diese Ergebnisse ebenfalls signifikant bestätigt werden (Diagramm 10 und 11). Die Überlegenheit der S1FG-behandelten Tiere in der regionalen Blutflussanalyse kann auf die deutlich verbesserte Arteriogenese und der tendenziell, jedoch nicht signifikanten, Angiogenese zurückgeführt werden.

5.3. Signalweg von SDF-1, Fractalkine und eEPCs

Für SDF-1 und eEPCs konnte gleicherweise ein positiver Effekt auf die Neovaskularisation in der Literatur nachgewiesen werden. Um beide Effekte (Gen- und Stammzelltherapie) miteinander zu verbinden, wurde mittels eines Fractalkine-Gerüsts ein Adhäsionsmolekül so konstruiert, dass hier über die SDF-1-CXCR4-Achse eine verstärkte Rekrutierung von eEPCs erzeugt wurde. Es wird dabei die

direkte Interaktion von SDF1 mit dem CXCR4, der auf EPCs exprimiert wird, gezielt genutzt. Jedoch kann hier nicht allein von diesem Effekt der gesteigerten Rekrutierung ausgegangen werden, sondern es muss zusätzlich bedacht werden, dass das artifizielle Molekül aus SDF-1 und Fractalkine auch indirekt angiogene Effekte auf endogene Knochenmarkszellen (CD34-positive Zellen) durch eine verstärkte Migration und Adhäsion in ischämischen Geweben haben und somit die Ausbildung neuer Gefäße induzieren können. Fractalkine selbst kann auch Angiogenese induzieren, indem es Endothelzellmigration und Gefäßformation über seinen Rezeptor CX3CR1 bedingt [Volin et al. 2010]. Die über SDF-1 erfolgte Zellaktivierung via CXCR4 führt zur verstärkten β -Integrin-vermittelten und zusätzlich Fractalkine-vermittelten Adhäsion von eEPC, die sich in einer erhöhten Kapillardichte widerspiegelt [Chade et al. 2010]. SDF-1 [Yin et al. 2011; Ho et al. 2010] und Fractalkine [Volin et al. 2010] interagieren nach Bindung an ihre Rezeptoren beide über die Phosphorylierung von Erk 1/2 und Aktivierung der MAP-Kinase, wobei SDF-1 eine PI3K/Akt vermittelte Inhibition hypoxiebedingter Apoptose von Stammzellen bewirkt, dagegen Fractalkine eine Zellmigration. Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges durch SDF-1 vermittelt weiterhin Chemotaxis, Zellproliferation und Regulation von Integrinen. Die Integrinaktivierung führt wiederum zur verstärkten Zellmigration und –adhäsion via Erk1/2-Aktivierung und NF κ B-Aktivierung. Ebenfalls wird über diese beiden Signalwege die antiapoptotische Wirkung des SDF-1 vermittelt [Ho et al, 2010; Yin et al. 2011].

In Abb. 29 konnte die Kolokalisation von SDF-1 zum Endothel von Gefäßen dargestellt werden, sodass davon ausgegangen wird, dass, wie bereits durch Grunewald et al. 2006 beschrieben, akzessorische Zellen (Perizyten) für die Sekretion von SDF-1 bzw. hier S1FG und die daraus folgende erhöhte Migration von eEPCs verantwortlich sind. Die Kombination von modifiziertem Chemokin und angiogenen Zellen führt zu einer gesteigerten Neovaskularisation.

Die Spaltung des SDF-1 durch DDP-IV bzw. MMP-2, die zur Inaktivierung von SDF-1 führt, muss jedoch beachtet werden. Eine SDF-1 Mutante, die gegen MMP-2 und DPP-IV resistent ist [Segers et al. 2007; Kanki et al. 2011], sowie die Hemmung der DDP-IV- vermittelten SDF-1-Spaltung mittels Diprotin A oder Parathormon [Zaruba et al. 2009; Huber et al. 2011; Theiss et al. 2011] zeigte eine gesteigerte SDF-1 Wirkung und damit eine erhöhte Anzahl von rekrutierten CXCR4-positiven Zellen,

was wiederum in einer verbesserten Angiogenese resultierte. Die MMP-2/DPP-IV-resistente SDF-Mutante konnte im ischämischen Hinterlauf einen verbesserten Blutfluss erzeugen [Segers et al. 2011]. Der Weg der verlängerten biologischen Aktivität von SDF-1 kann einen weiteren Ansatz zur verbesserten Neovaskularisation darstellen.

Eine potente Mobilisation von endogenen hämatopoetischen Stammzellen und EPCs aus dem Knochenmark kann weiterhin durch die Blockade des selektiven CXCR4-Rezeptors mittels AMD3100 erzielt werden [Yin et al. 2007].

5.4. Ausblick für die therapeutische Neovaskularisierung und Grenzen des Modells sowie Grenzen bei der Anwendung am Menschen

Die vorliegende Arbeit konnte eine gesteigerte Rekrutierung von eEPCs in vitro und in vivo im Modell der chronischen Ischämie am Kaninchenhinterlauf darstellen. In den weiterführenden Analysen konnte der EPC-vermittelte Effekt der Neovaskularisation durch S1FG noch gesteigert werden. Jedoch sind bei dem genutzten Modell der chronischen Hinterlaufischämie verschiedene Limitationen vorhanden. Erste Anwendungsgrenze des Modells ist die xenogene Transplantation von murinen eEPCs in Kaninchen. Trotz des nur gering ausgebildeten Effekts der Immunogenität durch die MHC-I-Negativität, kann dieses Modell bisher nur in Tiermodell und nicht in der Anwendung beim Mensch genutzt werden.

Weiterhin muss die Komponente der transienten Transfektion des Endothels mit S1FG bedacht werden, die nur eine vorübergehende Überexpression des S1FG und damit ein zeitlich limitiertes Homing von sowohl exogenen als auch möglichen endogenen Zellen der Angiogenese bedeutet. Weiterhin spielt damit auch die Zeitlimitation der eEPC-Applikation eine entscheidende Rolle, da die maximale Überexpression von S1FG am Endothel nach ca. 48 Stunden erreicht ist. Andere Transfektionswege (z.B. via adenoassoziierten Viren) könnten eine verlängerte S1FG-Expression hervorrufen.

Außerdem ist ein weiterer begrenzender Faktor die Anzahl der applizierten Zellen. Für dieses Modell sind 5 Millionen eEPCs bzw. bei der Koapplikation mit S1FG 2 Millionen eEPCs verwendet worden. Bei Vorversuchen konnte kein Unterschied

zwischen S1FG mit 2 Millionen eEPCs verglichen mit 5 Millionen eEPCs festgestellt werden. Dagegen zeigte sich jedoch eine reduzierte eEPC-induzierte Angiogenese bei alleiniger Applikation von 2 Millionen eEPCs verglichen mit der Gabe von 5 Millionen Zellen. Eine höhere Gabe von Zellen könnte diskutiert werden, jedoch sollte man dann auch die Toxizität von absterbenden eEPCs und deren negative Auswirkungen, z.B. überschießender Inflammation mit letztlich Reduktion der Angiogenese bedenken.

Auch der alleinige Effekt von S1FG auf die Angiogenese oder die Kombination eines selektiven SDF-1-Inhibitors (z.B. AMD3100) und deren Auswirkung auf die Angiogenese stellen weiter interessante Ansatzpunkte dar [Yin et al. 2007]. Inwiefern andere Wachstumsfaktoren auf die erhöhte Expression der Chemokine SDF-1 und Fractalkine beeinflusst werden, kann mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Yu et al. konnten 2009 durch die kombinierte Anwendung von VEGF und SDF-1 eine deutlich gesteigerte EPC-Rekrutierung gegenüber der alleinigen Anwendung der Moleküle nachweisen. Diese Studie zeigt die engen Interaktionen der einzelnen beteiligten Faktoren an der Rekrutierung von EPC und somit Induktion der Angiogenese, was bereits von Grunewald et al. 2006 beschrieben wurde.

Aus diesen Ergebnissen der Arbeit stellt sich weiterhin die Frage, ob sich dieses Modell auf die Anwendung bei chronischer Ischämie des Menschen (pAVK, KHK, Schlaganfall) übertragen lässt. Ein wichtiger Punkt ist dabei, dass die Wirkungen von xenogenen Zelltransplantationen am Menschen nicht ausreichend bekannt sind, da die induzierte inflammatorische Antwort durch die murinen eEPCs den Effekt der Angiogenese vermutlich überwiegt und somit als mögliche Therapie derzeit wegfällt.

Andere Anwendungsbegrenzungen beziehen sich auf den Einsatz der Gentherapie am Menschen: Ist die gezielte endotheliale Expression des Zielgens, d.h. ohne Beeinflussung anderer Gewebe bzw. Organe, möglich? Wie ausgeprägt ist die Immunogenität des S1FGs oder anderer Zielgene im menschlichen Organismus? Kommt es dabei zu lokalen oder gar zu systemischen Reaktionen, die der eigentlichen Wirkung – Angiogenese – entgegenwirken? Welche Nebenwirkungen erzeugt die Überexpression? Kommt es dadurch zu Häufungen von Tumorbildung, Ödembildung oder gar zu Kreislaufinstabilität? Kann die therapeutische Angiogenese durch Gabe von Genen und, oder Zellen an anderen Organen zu Schäden führen (z.B. durch Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques mit Folge eines

Herzinfarkts oder Schlaganfalls, oder durch Ausbildung einer proliferativen Retinopathie durch VEGF-Überexpression)?

Weiterhin bleibt die Frage der Applikation der Vektoren bzw. Zellen: lokal oder systemisch? Für die lokale Applikation spricht, dass hier höhere Dosen gegeben werden könnten ohne weitere systemische Risiken einzugehen.

Die gezielte Beeinflussung des Homings von (autologen) Stammzellen oder Progenitorzellen in ischämischen Arealen im Menschen könnte mit diesem Molekül ermöglicht werden.

Da Diabetes, Rauchen, Hyperlipidämie etc. zur gestörten Migration, Adhäsion und Proliferation von EPCs führen kann, darf jedoch nicht vergessen werden, dass vorhandene kardiovaskuläre Risikofaktoren nach wie vor reduziert werden müssen.

In der Tumorforschung und -therapie werden dagegen antiangiogene Effekte verwendet, bei arteriosklerotischen Erkrankungen (KHK, pAVK, Schlaganfällen) werden dagegen die proangiogenen Effekte der Angiogenese genutzt. Sobald es etablierte Methoden zur Erzeugung einer erhöhten Anzahl von induzierbaren pluripotenten Stammzellen gibt, kann deren Einsatz in der Gen-/ Zelltherapie der therapeutischen Neovaskularisation erwogen werden.

5.5. Zusammenfassende Diskussion

Chronisch ischämisch bedingte Minderdurchblutungen wie im Krankheitsbild der pAVK bieten nach Optimierung der Risikofaktoren sowie der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern wie Aspirin oder Clopidogrel oft nur noch die interventionelle oder operativer Revaskularisation als Therapieoption. Bestehen jedoch keine Interventionsmöglichkeiten mehr, sind Komplikationen wie Gangrän oder Wundheilungsstörungen nach kleineren Verletzungen häufig, welche eine Amputation der Gliedmaße zur Folge haben könnten.

In dieser Arbeit wurden in einem tierexperimentellen Ansatz aufgrund Zell- und vektorbasierter Gentherapie neue Optionen der therapeutischen Neovaskularisation untersucht. Dabei wurde ein auf SDF-1 und Fractalkine basierendes Adhäsionsmolekül konstruiert und dessen Effekt auf Monozyten- und eEPC-Adhäsion hin untersucht.

Das deutlich gesteigerte Homing von eEPCs durch die S1FG-Transfektion in vivo führte zu weiteren Untersuchungen bezüglich der eEPC-vermittelten Neovaskularisation. Der vor allem SDF-1-CXCR4-vermittelte Effekt konnte mittels des stabilisierenden Fractalkines noch weiter verstärkt werden.

Die eEPC-induzierte Neovaskularisation im ischämischen Kaninchenhinterlauf konnte durch eine vorangegangene Transfektion durch das artifizielle Adhäsionsmolekül S1FG gesteigert werden. Dabei waren vor allem ein deutliches Kollateralwachstum und eine Perfusionsverbesserung vorhanden, was einer gesteigerten Arteriogenese entspricht. Im Angiogenesebereich konnte dagegen keine signifikante Steigerung erreicht werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine mögliche Therapieform der pAVK aufgrund einer durch ein Adhäsionsmolekül gesteigerten zellbasierten Neovaskularisation im xenogenen Tiermodell gezeigt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA. Chemokines in vascular pathology (review). *Int J Mol Med*. 2006. 17(5):691-701.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998. 101:40– 50.
- Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002. 11(2):171-8.
- Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004. 287(3):C572-9.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearney M, Magner M, and Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999. 85:221–228.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997. 275:964–967.
- Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003. 362:697–703.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Ross D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997. 385:640–644.
- Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods*. 2003. 273(1-2):83-101.
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 1992 Feb;114(2):521-32.
- Brown D, Wanek GL. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J Am Soc Nephrol*. 1992. 3(4):895-906.
- Brown MD, Hudlicka O. Protective effects of long-term bradycardial pacing against catecholamine-induced myocardial damage in rabbit hearts. *Circ Res* 1988. 62:965– 74.
- Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2008. 15(1):49-58.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003. 9(6):653-60.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-395.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004. 10:858–864.
- Chade AR, Zhu XY, Krier JD, Jordan KL, Textor SC, Grande JP, Lerman A, Lerman LO. Endothelial progenitor cells homing and renal repair in experimental renovascular disease. *Stem Cells*. 2010. 28(6):1039-47.
- Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, and Melby PC. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor κ B (NF- κ B)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* 373: 547–558, 2003.

Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004. 95(9):858-66.

Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*. 2005. 201:63–72.

Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 2008. 45(4):514-22.

Christopherson KW 2nd, Hangoc G, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):7000-8.

Crola Da Silva C, Lamerant-Fayel N, Paprocka M, Mitterrand M, Gosset D, Dus D, Kieda C. Selective human endothelial cell activation by chemokines as a guide to cell homing. *Immunology*. 2009. 126(3):394-404.

De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, Pesce M. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*. 2004; 2003–12.

Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, Lach R, Hock TD, Chen B, Hill-Kapturczak N, Siegal GP, Dulak J, Jozkowicz A, Grant MB, Agarwal A. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007. 204(3):605-18.

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001. 108(3):391-7.

Dorsaz PA, Doriot PA, Dorsaz L, Chatelain P, Rutishauser W. A new densitometric approach to the assessment of mean coronary flow. *Invest Radiol* 1997. 32:198– 204.

Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol*. 2007. 11(1):18-25.

Espinola-Klein C, Savvidis S. Periphere arterielle Verschlusskrankheit. *Der Internist* 2009. 50:519-926

Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*. 1999. 112 (Pt 17):2799-809.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*. 2000;55:15-35; discussion 35-6. Review.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987. 235(4787):442-7.

Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation*. 1998 Mar 31;97(12):1108-10.

Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel D. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 1998. 188:1413–1419.

Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, Leré-Déan C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouët J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S. PSGL-1-mediated activation

of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2007. 117(6):1527-37.

Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, Dodge Jr, JT, Alexander Jr, B, Marble SJ, et al. TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow. *Circulation* 1996. 93:879–88.

Gresele P, Busti C, Fierro T. Critical limb ischemia. *Intern Emerg Med* 2011. 6.Suppl 1:129-134.

Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006. 124:175– 89.

Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, and Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development*. 1998. 125: 1457–1468.

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002. 109(5):625-37.

Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, Hartman HA, Gilberto DB, Rogers IT, Cook JJ. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res*. 2001. 49(3):618-25.

Ho TK, Tsui J, Xu S, Leoni P, Abraham DJ, Baker DM. Angiogenic effects of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) variants in vitro and the in vivo expressions of CXCL12 variants and CXCR4 in human critical leg ischemia. *J Vasc Surg*. 2010 Mar;51(3):689-99.

Hoessli DC, Robinson PJ. GPI-anchors and cell membranes: a special relationship. *Trends Cell Biol*. 1998 Feb;8(2):87-9.

Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW, Anand R, Williams AF. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*. 1988 May 19;333(6170):269-72.

Hristov M, Zerneck A, Schober A, Weber C. Adult progenitor cells in vascular remodeling during atherosclerosis. *Biol Chem*. 2008. 389(7):837-44.

Huang NF, Niiyama H, Peter C, De A, Natkunam Y, Fleissner F, Li Z, Rollins MD, Wu JC, Gambhir SS, Cooke JP. Embryonic stem cell-derived endothelial cells engraft into the ischemic hindlimb and restore perfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010. 30(5):984-91.

Huber BC, Brunner S, Segeth A, Nathan P, Fischer R, Zaruba MM, Vallaster M, Theiss HD, David R, Gerbitz A, Franz WM. Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4(+) stem cells into the ischaemic heart. *Cardiovasc Res*. 2011 Jun 1;90(3):529-37. Epub 2011 Jan 18.

Huppert P, Tacke J, Lawall H. S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. *Der Radiologe* 2010. 50:7-15

Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997. 91:521–530.

Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2004. 11: 15–21.

- Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jun;4(6):432-44.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll W, Silver M, Kearney M, Li T, Isner J, and Asahara T. Transplantation of ex-vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97:3422–3427.
- Kanki S, Segers VF, Wu W, Kakkar R, Gannon J, Sys SU, Sandrasagra A, Lee RT. Stromal cell-derived factor-1 retention and cardioprotection for ischemic myocardium. *Circ Heart Fail.* 2011 Jul;4(4):509-18.
- Kasama T, Wakabayashi K, Sato M, Takahashi R, Isozaki T. Relevance of the CX3CL1/fractalkine-CX3CR1 pathway in vasculitis and vasculopathy. *Transl Res.* 2010. 155(1):20-6.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, and Asahara T. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001. 103:634–637.
- Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med.* 2005. 56:79-101.
- Kopp CW, Steiner S, Minar E. Therapeutische Angiogenese bei peripher-arterieller Verschlusskrankheit. *J Kardiologie* 2004. 11:79-83
- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007. 292(3):C987-95
- Kucia M, Jankowski K, Reca R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol.* 2004. 35(3):233-45.
- Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzec J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* 2005. 23(7):879-94.
- Kupatt C. The vascular compartments of neovascularization: spotlight on the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007. 8(1):27-33.
- Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, Thalgott M, Büttner K, Browarzik C, Mages J, Hoffmann R, Deten A, Lamparter M, Müller F, Beck H, Büning H, Boekstegers P, Hatzopoulos AK. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J.* 2005. 19(11):1576-8.
- Kupatt C, Hinkel R, von Brühl ML, Pohl T, Horstkotte J, Raake P, El Aouni C, Thein E, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P. Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2007. 49(14):1575-84.
- Kupatt C, Hinkel R, Pfosser A, El-Aouni C, Wuchrer A, Fritz A, Globisch F, Thormann M, Horstkotte J, Lebherz C, Thein E, Banfi A, Boekstegers P. Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol.* 2010. 56(5):414-22.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. [see comments] *Nat Med* 2000. 6:1004– 10.

- Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002. 30(9):973-81.
- Lawall H, Diehm C, Balzer K. Deutsche Gesellschaft für Angiologie, Gesellschaft für Gefäßmedizin. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK). 2009 VASA 38 (Suppl): 1-72.
- Lebherz C, von Degenfeld G, Karl A, Pfosser A, Raake P, Pachmayr F, Scholz D, Kupatt C, Boekstegers P. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium*. 2003. 10(4-5):257-65.
- Lee, Seon-Jin, Seung Namkoong, Young-Mi Kim, Chun-Ki Kim, Hansoo Lee, Kwon-Soo Ha, Hun-Taeg Chung, Young-Guen Kwon, and Young-Myeong Kim. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006. 291: H2836–H2846.
- Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004b. 109(21):2487-91.
- Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004a. 109(22):2692-7.
- Low MG. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J*. 1987. 244(1):1-13.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1182-90.
- Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res*. 2003; 58:390–398.
- McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, et al. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol* 1999. 213:442–456.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43503-8. Epub 2001 Sep 24.
- Medof ME, Nagarajan S, Tykocinski ML. Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins. *FASEB J*. 1996 Apr;10(5):574-86.
- Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity*. 2001. 14:377–386.
- Nikol S. Gen- und Stammzelltherapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. *Clin Res Cardiol Suppl* 2007. 2:IV/30-IV/37.
- Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, Masuda H, Nitta N, Asahara T, Isobe M. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. 27(3):512-8.
- Pfosser A, Thalgot M, Büttner K, Brouet A, Feron O, Boekstegers P, Kupatt C. Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia. *Cardiovasc Res*. 2005. 65(3):728-36.

- Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am.J.Physiol* 1999; 276: H1801-H1806.
- Rae PC, Kelly RD, Egginton S, St John JC. Angiogenic potential of endothelial progenitor cells and embryonic stem cells. *Vasc Cell*. 2011. 11;3:11.
- Rafii, S., and Lyden, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med*. 2003. 9,702–712.
- Risau W. Angiogenesis and endothelial cell function. *Arzneimittelforschung*. 1994 Mar;44(3A):416-7. Review.
- Rossi DL, Hardiman G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins N, Zlotnik A, Bazan JF. Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. *Genomics*. 1998. 47(2):163-70.
- Ryu J, Lee CW, Hong KH, et al: Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGFA/ KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 333–340.
- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23(7):1143-51.
- Scheinert D, Schmidt A. Periphere arterielle Verschlusskrankheit. *Clin Res Cardiol Suppl* 2007. 2:123-136
- Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res*. 2007. 101(2):125-36.
- Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008. 28(11):1950-9
- Schober A, Zerneck A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2007. 97(5):730-7.
- Schulte KL, Arterielle Verschlusskrankheit. *Der Internist* 2009. 50:927-935
- Schulz C, Schäfer A, Stolla M, Kerstan S, Lorenz M, von Brühl ML, Schiemann M, Bauersachs J, Gloe T, Busch DH, Gawaz M, Massberg S. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation*. 2007. 116(7):764-73.
- Segers VF, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation*. 2007 Oct 9;116(15):1683-92.
- Segers VF, Revin V, Wu W, Qiu H, Yan Z, Lee RT, Sandrasagra A. Protease-resistant stromal cell-derived factor-1 for the treatment of experimental peripheral artery disease. *Circulation*. 2011 Mar 29;123(12):1306-15
- Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*. 1995. 28(3):495-500
- Swanson DK, Myerowitz PD, Hasegawa B, Van Lysel MS, Watson DW, Frantz DW, et al. Videodensitometric quantitation of mean blood flow. *J Surg Res* 1983. 34:524–32.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner J, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999. 4:434–438

Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010. 16(11):2927-31.

Thein E, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F, Messmer K. Comparison of Regional Blood Flow Values Measured by Radioactive and Fluorescent Microspheres. *Eur Surg Res* 2002. 34:215–223

Thein E, Raab S, Harris AG, Messmer K. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput.Methods Programs Biomed*. 2000; 61: 11-21.

Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, Krieg L, Zaruba MM, Brunner S, Vanchev Y, Fischer R, Gröbner M, Huber B, Wollenweber T, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Hacker M, Franz WM. Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem Cell Res*. 2011 Nov;7(3):244-55. Epub 2011 May 16.

Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004. 24(1):34-40.

Volin MV, Huynh N, Klosowska K, Reyes RD, Woods JM. Fractalkine-induced endothelial cell migration requires MAP kinase signaling. *Pathobiology*. 2010. 77(1):7-16.

Walenta KL, Bettink S, Böhm M, Friedrich EB. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations. *Basic Res Cardiol*. 2011. 106(2):299-305.

Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, Vlastos GA, Chan G, Fischer KD, Rattat D, Debatin KM, Hatzopoulos AK, Beltinger C. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell* 2004. 5 (5):477-88.

Yamaguchi JI, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003. 107:1322–1328.

Yin Q, Jin P, Liu X, Wei H, Lin X, Chi C, Liu Y, Sun C, Wei Y. SDF-1 α inhibits hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells through PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Mol Biol Rep*. 2011 Jan;38(1):9-16.

Yin Y, Huang L, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, Cui B. AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine/paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007. 50(1):61-7.

Yu JX, Huang XF, Lv WM, Ye CS, Peng XZ, Zhang H, Xiao LB, Wang SM. Combination of stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J Vasc Surg*. 2009. 50(3):608-16.

Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz WM. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2009 Apr 3;4(4):313-23.

Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. 28(4):644-50.

Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res.* 1984. 18(12):724-32.

7. *Abbildungsverzeichnis, Software und Datenbanken*

7.1. *Datenbanken*

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

7.2. *Software*

Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, USA)
SPSS 17 SPSS Inc., Chicago, USA
Carl Zeiss AxioVision 4.7 (Carl Zeiss Vision GmbH; München)
XFluor4-Software (tecan)

7.3. *Abbildungsverzeichnis/ Quellennachweis*

Abb. 1: Signaltransduktionswege der SDF-1/ CXCR4-Achse aus Kucia et al. 2004

Abb. 2: www.ibibdi.de

Abb. 5: Kramer H, Institut für klinische Radiologie, Klinikum Großhadern, München
2008

Abb. 6: SPU-Gefäßsystem aus Raab et. al 1999

8. Abkürzungen

AC 133	Oberflächenmarker (=CD 133)
AcLDL	Acetyliertes LDL
AD	M. adductus
Akt	Proteinkinase B
Ang 1 bzw. 2	Angiopoetin 1 bzw. 2
(b)FGF	(Basischer) Fibroblasten Wachstumsfaktor
BMC	Knochenmarkszellen
CCR	Chemotaktischer Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
c-Kit	Stammzellfaktor Rezeptor (CD117)
CXCR	Chemotaktischer Rezeptor
DDP-IV	Dipeptidylpeptidase 4 (=CD26)
Dil	1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
ELR-Motif	konsverierte Aminosäuresequenz von Chemokinen (Glutamin- Leucin- Arginin)
Engl.	englisch
(e)EPC/eEPCs	(Embryonale) Endotheliale Progenitorzelle/n
eNOS	Endotheliale Stickoxid Synthase
EPO	Erythropoetin
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
Fi	M. fibularis
flk-1	Tyrosin-Kinase Rezeptor (VEGF-Rezeptor) 1
Fv	forward-Primer
GATA 4 bzw. 6	hämatopoetische Transkriptionsfaktoren
GC	M. gastrocnemius
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen – Kolonie stimulierender Faktor
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

GRO α	growth regulated oncogene- α
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor - 1 alpha
HMG-CoA	s-Hydroxy-s-methylglutaryl-Coenzym A
HO-1	Hämoxygenase-1
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
hsp90	Heat shock protein 90 (Chaperon)
HUVEC(s)	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IGF-1	Insulinartiger Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IP10	interferon-gamma induced protein 10 (=CXCL10)
IL-8-FG	Interleukin 8-Fractalkine-GPI
IP10-FG	IP10-Fractalkine-GPI
KHK	Koronare Herzkrankheit
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monozyten chemoattraktives Protein-1
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (= MAP-Kinase)
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex-I
MiF	Macrophage migration inhibitor factor
MMP	Matrixmetalloproteinase
MW	Mittelwert
NF κ B	nuklearer Faktor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasetettenreaktion
PDGFA	Platelet-derived Growth Factor A
PI-3	Phospho-Inositol-3-Kinase
PIGL	Plazenta Wachstumsfaktor
PSGL-1	P-Selektin Ligand
RNS/RNA	Ribonukleinsäure/ Ribonucleinacid

RT	Reverse Transkription
rt-PCR	„real time“ - Polymerase Ketten Reaktion
Rv	Reverse-Primer
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (=CD31)
Sca-1	Stammzell-Antigen 1
SDF-1	Stromal derived factor 1 (=CXCL12 = PBSF)
S1FG	SDF-1-Fractalkine-GPI
SEM	Standardfehler
SMC(s)	Glatte Muskelzelle(n)
TGF	Transforming Growth Factor
Tie-2	Tyrosinkinase-Rezeptor 2
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel

9.1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. med. Christian Kupatt für die Themenstellung, die Ermöglichung meiner Dissertation und die ausgezeichnete Betreuung in seiner Arbeitsgruppe.

Weiterhin möchte ich mich bei Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Aufnahme in und Durchführung des *Promotionsstudiums Molekulare und systembiologische Medizin bedanken*. Die Aufnahme in dieses Programm hat mir die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert.

Dr. med. Achim Pfosser, Dr. rer. nat. Chiraz El-Auoni und Dr. med. vet. Rabea Hinkel möchte ich für alle wissenschaftlichen Ratschläge und für alle persönlichen Gespräche danken. Durch ihre stetige Hilfsbereitschaft haben sie mir das Arbeiten im Labor oft sehr erleichtert und für eine besonders freundschaftliche Stimmung gesorgt.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Perter Nelson für die Bereitstellung der Vektoren und der konstruktiven Zusammenarbeit. Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl gilt mein Dank für die Bereitstellung des Tier-OPs im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin zur Durchführung der Experimente. Besonders möchte ich mich auch bei Frau B. Blount und ihrem Team im Tierstall bedanken.

Schließlich möchte ich mich noch bei Frau Susanne Helbig für die Einführung in alle Laborarbeiten sowie für die vielen Ratschlägen besonders bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Hagen für ihr großes Verständnis und die Unterstützung meines Studiums sowie meinem lieben Ehemann Jürgen für die moralische Unterstützung vor allem in der letzten Zeit der Arbeit. Ohne sie alle wäre die Durchführung der vorliegenden Arbeit in diesem Rahmen nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare und systembiologische Medizin - Förderung für Forschung und Lehre“ der LMU München. Teile der Arbeit werden veröffentlicht.

9.2. Lebenslauf

Abstracts und Posterpräsentationen

C. El-Aouni, **F. Globisch**, P. Nelson, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Chemokines fused to a fractalkine backbone and a GPI-anchor attract monocytes and embryonic EPCs*. Annual meeting of the society for microcirculation and vascular biology 2007

A. Pfosser, O. Pinkenburg, M. Böttcher, M. Dietz, C. Dinges, A. Fritz, **F. Globisch**, R. Bals, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Therapeutische Neovaskularisation durch AAV-basierten Gentransfer von LL-37 im ischämischen Hinterlauf (Kaninchen-Modell)*. Clin Res Cardiol 96: Suppl 1 (2007)

A. Pfosser, O. Pinkenburg, M. Böttcher, **F. Globisch**, M. Dietz, C. Dinges, A. Fritz, Ch. El-Aouni, R. Bals, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Therapeutic Neovascularization by AAV2-Based gene transfer in the Ischemic Hindlimb (Rabbit Model)*. Circulation. 2007;116: 16S_. (Vortrag)

C. El-Aouni, **F. Globisch**, A. Pfosser, P. Nelson, R. Hinkel, A. K. Hatzopoulos, P. Boekstegers, C. Kupatt. *SDF-1 fused to a fractalkine backbone and a GPI-anchor recruits embryonic EPCs to the ischemic vasculature*. Clin Res Cardiol 97- Suppl 1, V73 (Vortrag) 2008

A. Pfosser, C. El-Aouni, **F. Globisch**, C. Dinges, A. Fritz, S. Sultana, R. Hinkel, A. Banfi, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Therapeutic neovascularization by AAV2/9 based gene transfer of hVEGF-A and hPDGF in the ischemic hindlimb (rabbit model)*. Clin Res Cardiol 97- Suppl 1, P122 (Poster) 2008

C. El-Aouni, **F. Globisch**, A. Pfosser, G. Stachel, R. Hinkel, P. Boekstegers, Peter Nelson, C. Kupatt. *Chemokines fused to a fractalkine backbone and a GPI-anchor attract embryonic EPCs to the site of injury*. Circulation 2008; 118: 18S_509. (Vortrag)

A. Pfosser, **F. Globisch**, C. El-Aouni, C. Dinges, A. Fritz, S. Sultana, R. Hinkel, M. Thormann, C. Lebherz, A. Banfi, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Therapeutic neovascularization by AAV2/9 based gene transfer of hVEGF-A and hPDGF in the ischemic hindlimb (rabbit model)*. Circulation. 2008; 118:18S_279. (Poster)

F. Globisch, C. El-Aouni, A. Pfosser, G. Stachel, R. Hinkel, M. Thormann, P. Nelson, C. Kupatt. *SDF-1-Fractalkine-GPI-Fusionsmolekül erhöht die Rekrutierung der embryonalen Endothelialen Progenitor Zellen in ischämischer Muskulatur*. FöFoLe Vortrag 2008

C. El-Aouni, **F. Globisch**, A. Pfosser, G. Stachel, R. Hinkel, P. Boekstegers, P. Nelson, C. Kupatt. *Functional impact of pretreatment of ischemic tissue with artificial EPC recruiter molecule SDF-1-Fractalkine-GPI*. Clin Res Cardiol 98: Suppl 1 (2009), V930

A. Pfosser, C. El-Aouni, R. Hinkel, **F. Globisch**, M. Dietz, C. Dinges, A. Fritz, G. Stachel, M. Thormann, A. K. Hatzopoulos, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Improved recruitment of embryonic EPCs after transient p65-transfection is mediated by PSGL-1 in chronic ischemia*. Clin Res Cardiol 98: Suppl 1 (2009), V 824

R. Hinkel, A. Pfosser, M. Thormann, C. Lebherz, A. Wuchrer, **F. Globisch**, C. El-Aouni, A. Banfi, P. Boekstegers, C. Kupatt. *Overexpression of VEGF-A and PDGF-B via adeno-associated viral vectors resolves mal-perfusion in chronic ischemia: Role of vessel maturation*. 2010. P 689

G. Stachel, C. El-Aouni, A. Pfosser, **F. Globisch**, R. Hinkel, T. Trenkwalder, P. Boekstegers, P. Nelson, C. Kupatt. *Angiogenic effects of progenitor cell mobilization in chronic ischemia after regional application of the artificial EPC adhesion molecule SDF-1-Fractalkine-GPI*. 2010. P737

T. Trenkwalder, R. Hinkel, A. Pfosser, S. Sultana, **F. Globisch**, G. Stachel, C. Lebherz, I. Bock-Marquette, C. Kupatt. *Therapeutic neovascularization via Thymosin β 4 overexpression requires AKT activation and capillary sprouting in the calf muscles*. 2010. V1567

R. Hinkel, T. Trenkwalder, F. Gesenhues, A. Pfosser, G. Stachel, S. Sultana, **F. Globisch**, C. Lebherz, I. Bock-Marquette, C. Kupatt. *Thymosin β 4 induced capillary sprouting in the calf muscles mediates therapeutic neovascularization: evidence for backward signaling*. 2011. P690

Originalarbeiten

A. Pfosser, C. El-Aouni, I. Pfisterer, M. Dietz, **F. Globisch**, G. Stachel, T. Trenkwalder, O. Pinkenburg, R. Hinkel, M. Sperandio, A. Hatzopoulos, R. Bals, P. Boekstegers, C. Kupatt. *NF κ B activation in embryonic endothelial progenitor cells enhances neovascularization via PSGL-1 mediated recruitment: Novel role for LL37*. Stem Cells. 2010 Feb;28(2):376-85.

Kupatt C, Hinkel R, Pfosser A, El-Aouni C, Wuchrer A, Fritz A, **Globisch F**, Thormann M, Horstkotte J, Lebherz C, Thein E, Banfi A, Boekstegers P. *Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation*. J Am Coll Cardiol. 2010 Jul 27;56(5):414-22.